

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Efecto del periodo de lluvias y estiaje (seca) sobre la
prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* en truchas
arcoiris (*oncorhynchus mykiss*) en una piscigranja del
valle del mantaro**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Peter Charrie Janampa Sarmiento

Lima – Perú

2012

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres; que me han dado la fortaleza e incentivo para terminar este proyecto de investigación, y por concientizarme que esto no termina aquí, que es solo el comienzo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis, Dra. Nieves Sandoval; por la enseñanza, paciencia e incentivo constante, muchas gracias por la oportunidad brindada.

A los doctores Alberto Manchego, Francisco Suarez, Hermelinda Rivera, Merci Ramírez, Rosa Perales; por el tiempo que se tomaron para apoyarme en las diversas etapas que tomo realizar esta investigación.

A los amigos de la universidad Aimé, Bianca, Blanca, Chen, Carlos, Jim, Juan, Karina, Kim, Patricia, Taneo y Vicente; por la ayuda y consejo oportuno durante la elaboración de este trabajo.

A mi familia; por haber sido, y ser siempre, el soporte de mi vida.

CONTENIDO

	Pag
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Situación Actual de la Acuicultura.....	3
2.1.1 Acuicultura mundial.....	3
2.1.2 Acuicultura nacional.....	7
2.1.3. Cultivo de trucha Arco iris en el Perú.....	9
2.2. Cambio Climático.....	10
2.2.1. Definición de Cambio Climático.....	10
2.2.2. Manifestaciones y proyecciones del Cambio Climático en el Mundo y en el Perú.....	10
2.2.3. Cambio Climático: Situación del Valle del Mantaro.....	12
2.3 Cambio Climático y Acuicultura.....	13
2.3.1 Efectos directos.....	13
2.3.1.1. Calentamiento global.....	13
2.3.1.2. Cambios en el nivel del mar.....	14
2.3.1.3. Cambio en los vientos y eventos climáticos extremo...	14
2.3.1.4 Estrés hídrico.....	15
2.3.2. Efectos indirectos.....	15
2.3.2.1 Disponibilidad de harina y aceite de pescado.....	15
2.3.2.2 Impacto en las enfermedades.....	16
2.4. Trucha Arcoíris.....	17
2.4.1 Clasificación taxonómica.....	17
2.4.2 Características biológicas.....	17
2.4.3 Propiedades físico químicas del agua para crianza de Truchas	

Arcoíris.....	18
2.4.3.1 Propiedades físicas.....	18
2.4.3.2 Propiedades químicas.....	19
2.5. Enfermedad Bacteriana Renal.....	21
2.5.1. Antecedentes históricos.....	22
2.5.2. Etiología.....	22
2.5.2.1. Morfología celular y características bioquímicas.....	22
2.5.2.2. Taxonomía.....	23
2.5.2.3. Factores de virulencia.....	24
2.5.2.4. La proteína 57/58 kDa.....	25
2.5.2.5. Características de cultivo del <i>Renibacterium salmoninarum</i>	26
2.5.3 Epidemiología.....	27
2.5.3.1 Hospederos y distribución geográfica.....	27
2.5.3.2 Susceptibilidad.....	27
2.5.3.3 Prevalencia.....	28
2.5.4 Transmisión de la enfermedad.....	28
2.5.4.1 Transmisión horizontal y vertical.....	28
2.5.4.2 Transmisión por portadores y vectores.....	29
2.5.5.3 Reservorios.....	30
2.5.6 Periodo de incubación, signos clínicos y lesiones.....	30
2.5.6.1 Periodo de incubación.....	30
2.5.6.2. Signos clínicos.....	30
2.5.6 3. Lesiones macroscópicas externas e internas.....	30
2.5.6 4. Lesiones microscópicas.....	31
2.5.7 Patogénesis.....	31
2.5.8. Factores ambientales involucrados en el desarrollo de la enfermedad.....	34
2.5.8.1 Efectos de la temperatura y la dureza del agua.....	34
2.5.8.2 Efectos de la dieta.....	35
2.5.9 Diagnóstico.....	35
2.5.9.1 Diagnostico diferencial.....	36
2.5.9.2. Pruebas diagnosticas.....	37
A) Aislamiento e identificación bacteriológica del agente.....	37
B) Detección e identificación del antígeno.....	37

2.5.9.2.3. Pruebas moleculares.....	38
A) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	38
B) Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (PCR real time).....	39
2.5.10. Prevención y control.....	41
2.5.10.1. Prevención.....	41
2.5.10.2. Control.....	41
3. Materiales y Métodos.....	44
3.1. Lugar de Estudio.....	46
3.2. Información meteorológica.....	45
3.3. Evaluación Físico-Química del agua.....	45
3.4. Animales y Muestras.....	46
3.4.1. Tamaño de muestra.....	46
3.4.2. Características de la muestra.....	47
3.4.3. Cepas de referencia.....	48
3.5. Metodología.....	48
3.3.1. Obtención de muestras.....	48
3.3.1.1 Necropsias:.....	48
3.3.1.2 Obtención de muestra para PCR tiempo real:.....	49
3.3.2 Procesamiento de las muestras.....	49
3.3.2.1. Obtención de ADN.....	49
A) Preparación de las moliendas de tejido.....	49
B) Extracción de ADN.....	50
3.3.2.2. PCR tiempo Real.....	50
3.3.3. Análisis estadístico de los resultados.....	51
4. Resultados.....	52
4.1. Condiciones Pluviales.....	52
4.2. Caracterización de las propiedades físico-químicas del agua.....	54
4.3. Hallazgos de la Necropsia.....	55
4.3.1 Lesiones externas.....	56
4.3.2 Lesiones internas.....	62
4.4. Diagnostico por PCR a tiempo real.....	68
4.5. Asociación entre ciclo de lluvias y prevalencia de <i>R. salmoninarum</i> ...	68

5. Discusión.....	69
6. Conclusiones.....	73
7. Literatura Citada.....	74
8. Anexos.....	85
Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram-positivas.....	85
Anexo 2: Protocolo de PCR a tiempo real	87
Anexo 3: Resultados de la prueba de PCR a tiempo real para las muestras totales....	88

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el incremento de la precipitación pluvial sobre la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* detectado a partir de muestras de tejido (riñón y bazo) de truchas arcoíris en una piscigranja ubicada en la cuenca del valle del Mantaro. El trabajo se realizó en una piscigranja del departamento de Junín, en la provincias de Huancayo, en los meses de agosto, setiembre noviembre y febrero, durante el periodo de ciclo de lluvias 2011-2012. La fuente hídrica de la piscigranja es el río Chiapuquio, perteneciente a la cuenca del Valle del Mantaro. Las truchas fueron colectadas al azar y provenían de ovas nacionales y americanas. Se colectaron 60 animales por muestreo, 240 truchas en total por piscigranja, considerando una prevalencia de 5%. Los peces se recolectaron en relación al ciclo de lluvias en el valle del Mantaro. Agosto (Temporada seca), Setiembre, Noviembre (Temporada de inicio de lluvias), y Febrero (Temporada de lluvias). Se extrajo el ADN de riñón y bazo mediante la técnica de fenol-cloroformo y se realizó el PCR tiempo real, no obteniéndose genoma de *Renibacterium salmoninarum* en ninguna de las muestras, en ninguno de las temporadas del ciclo de lluvias. Se concluye que la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* en la piscigranja de estudio es 0%, por tanto no se pudo establecer asociación entre el ciclo de lluvias y la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum*.

Palabras Claves: Ciclo de lluvias, cambio climático, BKD, *Renibacterium salmoninarum*, PCR tiempo real, *Oncorhynchus mykiss*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the increase in rainfall on the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* detected from tissue samples (kidney and spleen) of rainbow trout in a fish farm located in the Mantaro Valley basin. The study was conducted at a fish farm in the department of Junín, in the province of Huancayo, in the months of August, September, November and February, during the rain cycle 2011-2012. The water source for the fish farm is Chiapuquio river belongs to the basin of the Mantaro Valley. The trout were randomly collected and eggs were from National and American. 60 animals were collected per sample, 240 total trout fish farm, considering a prevalence of 5%. Fish were collected in relation to the cycle of rainfall in the Mantaro Valley. August (dry season), September, November (rainy season start), and February (rainy season). DNA was extracted from kidney and spleen by phenol-chloroform technique and performed the real time PCR, yielding no *Renibacterium salmoninarum* genome in any of the samples, none of the rainy season cycle. We conclude that the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* in fish farm study is 0%, so could not be established association between the rain cycle and prevalence of *Renibacterium salmoninarum*.

Keywords: rain cycle, climate change, BKD, *Renibacterium salmoninarum*, real-time PCR, *Oncorhynchus mykiss*

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1:	Principales productores mundiales 2009 en acuicultura, incluida la producción de algas.....	4
Cuadro 2:	Cosecha acuícola por continente en miles de TM 2008- 2009 y su respectiva participación en la acuicultura mundial del año 2009.....	5
Cuadro 3:	Ranking de la producción de trucha a nivel mundial en TM periodos 2009 y 2010.....	6
Cuadro 4.	Producción en Toneladas métricas.de trucha arco iris en el 2010 en la zona americana.....	6
Cuadro 5:	Crecimiento de la acuicultura peruana por especie cultivada, periodo 2000-2010.....	8
Cuadro 6:	Participación de los diferentes niveles de desarrollo de la acuicultura peruana, cosecha 2010.....	9
Cuadro 7:	Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza comercial de trucha arcoíris.....	23
Cuadro 8.	Tamaño de muestra aleatoria en función de la supuesta prevalencia del patógeno en el lote, adjudicando a la técnica un 100% de sensibilidad y especificidad.....	48
Cuadro 9:	Esquema de toma de muestra para la piscigranja de acuerdo al patrón de desarrollo de las precipitaciones pluviales en la cuenca del valle del Mantaro descritas por el IGP.....	50
Cuadro 10:	PCR tiempo real. Temperatura de disociación (Tm) y ciclo umbral (CT) de los productos obtenidos para el set de cebadores diseñados para la proteína P57.....	53

Cuadro 11:	Cuadro 11: Resumen de los datos del ciclo de lluvias del periodo 2011-2012 registrados por la estación Ingenio del SENAMHI.....	55
Cuadro 12:	Climatología del acumulado mensual (mm/mes) de precipitación en la estación “Ingenio”.....	56
Cuadro 13:	Resultados físico-químicos del agua de la “Piscigranja” durante el Ciclo de Lluvias 2011-2012.....	57
Cuadro 14:	Lesiones externas en trucha arcoíris de la “Piscigranja”.....	59
Cuadro 15:	Lesiones internas halladas en trucha arcoíris de la “Piscigranja”.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Modelo de un posible mecanismo de acción de la p57.....	34
Figura 2:	Melanosis.....	58
Figura 3:	Exoftalmia(A), Opacidad ocular (B), Hipema (C), podredumbre de aleta caudal (D), Ulcera lateral en piel (E).....	60
Figura 4 :	Escoliosis (A), Distensión abdominal (B).....	61
Figura 5:	Palidez branquial.....	61
Figura 6:	A: Palidez hepática, Esplenomegalia B: Congestión de ciegos pilóricos, Congestión y dilatación del Intestino posterior, Renomegalia.....	64
Figura 7:	Atrofia del tejido graso peritoneal.....	64
Figura 8:	Congestión del tejido graso peritoneal.....	65
Figura 9:	Distensión gástrica.....	65
Figura 10:	Granulomas en riñón.....	66
Figura 11	Hemorragia equimótica en hígado, B: Hemorragia petequial en ciegos pilóricos, Hemorragia petequial en tejido graso peritoneal.....	67
Figura 12	Granulomas en Hígado.....	68

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram Positivas.....	89
ANEXO 2: Protocolo de PCR a Tiempo Real.....	91
ANEXO 3: Resultados de la prueba de PCR a tiempo o real para las muestras totales.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
BKD:	Enfermedad bacteriana renal (del inglés: <i>Bacterial Kidney Disease</i>)
Ct:	Ciclo Umbral (Threshole Cycle)
IF:	Inmunofluorescencia
IFI:	Inmunofluorescencia Indirecta
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (del ingles <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
IGP:	Instituto Geofísico del Perú
KDM2:	Segundo Medio de cultivo para la Enfermedad Renal (del ingles <i>Kidney Disease Médium</i>)
SKDM2:	Segundo Medio de Cultivo Selectivo para la Enfermedad Renal (del ingles <i>Selective Kidney Disease Médium</i>)
MINAM:	Ministerio del Ambiente del Perú
Msa:	Principal antígeno soluble (del inglés: <i>Major soluble antigen</i>)
ONU:	Organización de Naciones Unidas.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRODUCE:	Ministerio de la Producción del Perú

PromPeru:	Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo
RT-PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (del inglés: <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>)
T _m :	Temperatura de disociación (melting)
UNEP:	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (del inglés <i>The United Nations Environment Programme</i>)

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura peruana ha mostrado un crecimiento considerable en los últimos diez años, como resultado de esto, tenemos que en el 2010 nuestra cosecha acuícola alcanzó las 89 mil TM según los datos estadísticos del ministerio de la producción. Esto nos ubicaría en el ranking de América Latina y El Caribe en el puesto N° 5, después de Chile, Brasil, México y Ecuador por representar el 4.2% de la cosecha de acuicultura estimada para la región (2 millones de TM) para ese año.

Actualmente, existen regiones que vienen convirtiéndose en las principales zonas de producción acuícola en el país, por sus características ambientales y condiciones para el desarrollo de un buen cultivo de acuicultura y áreas apropiadas, tal es así que se ha caracterizado a Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno como las principales zonas para la producción de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En consecuencia para el 2010 el Perú con sus 16,313 TM de trucha arco iris es ubicado en el Puesto N° 12 a nivel mundial y en el Puesto N° 3 a nivel de América y el Caribe después del primer productor mundial, Chile (155,355 TM), y EEUU de Norteamérica (16,911 TM).

Los volúmenes de cosecha de trucha arco iris en el Perú ha venido incrementándose de manera significativa desde el año 2001 a una tasa de crecimiento anual de 20 %, alcanzando en el año 2010 poco más de 16,3 mil TM, ello representa también un incremento del 27,28 % respecto a la cosecha registrada en el año 2009 (12 817 TM). A partir de esto PRODUCE ha proyectado de manera moderada que la cosecha de la trucha arco iris en el 2015 podría alcanzar entre las 30 mil y 35 mil TM; de igual modo, de continuar dicha tendencia, no existir enfermedades y continuar con la expansión tanto del mercado interno como el externo, se esperaría que para el año 2018 se podría esperar que la cosecha de esta especie se encuentre entre las 55 mil y 60 mil TM.

Sin embargo en nuestro país, el conocimiento del estatus sanitario de truchas de cultivo aún está desarrollándose. Entre las enfermedades que ocasiona alta morbilidad en el mundo, se encuentra la Enfermedad Bacteriana Renal o BKD, producida por la bacteria Gram-positiva, *Renibacterium salmoninarum*. La trucha arco iris, se considera relativamente resistente a esta enfermedad dentro del grupo de los salmónidos, sin embargo produce una alta merma de la producción por su característica crónica y daño orgánico generalizado por la formación de granulomas en diversos órganos como riñón, hígado y bazo. Además, esta bacteria se transmite horizontal y verticalmente, siendo esta última de importancia debido a que nuestra producción depende casi exclusivamente de la importación de ovas embrionadas, característica que incrementa el riesgo de transmisión a la progenie y su potencial impacto en nuestra acuicultura nacional de tornarse endémico. Actualmente, se ha demostrado su presencia en truchas de piscigranjas del país, localizadas en Junín, mediante diagnóstico histopatológico, Inmunofluorescencia y PCR Tiempo Real.

Por otra parte, de acuerdo a lo mencionado por la FAO, el cambio climático se convertiría en una amenaza por producir calentamiento de las aguas, el cual afectaría la acuicultura en zonas de aguas frías y templadas y en especial en zonas marinas, debido que al aumentar la temperatura del agua podría existir una proliferación de algas que no permitirían que sobrevivan los peces por la competencia en la demanda de oxígeno. De igual modo, por el incremento de la temperatura, existiría la aparición de nuevos patógenos que podrían causar algún efecto negativo sobre peces y moluscos. Así mismo, también existen preocupaciones sobre los cambios en el calendario, la intensidad y la duración de las crecidas, el cual se involucra en la calidad de agua en los sistemas de producción de acuicultura continental.

El cambio climático, es un aspecto que debe ser estudiado, evaluando su posible efecto que podría tener en la acuicultura, para luego, basado en ello, definir estrategias y acciones que conlleven a que la acuicultura peruana se adapte y aproveche también sus posibles efectos positivos y dar una adecuada respuesta a los posibles efectos negativos. Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ciclo de lluvias durante el periodo 2011-2012, sobre la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en una piscigranja del valle del Mantaro-Junín.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

2.1.1 Acuicultura mundial

La acuicultura mundial en los últimos 30 años, ha tenido un crecimiento importante a una tasa anual de 8.3%, ello debido a una mayor intensificación de los principales cultivos comerciales, la diversificación de especies con alta demanda en los mercados y el aumento de la maricultura con tendencia a realizar cultivos “off shore” o en mar abierto (PRODUCE, 2011)

El consumo per cápita aparente de los productos de acuicultura en el 2008 a nivel mundial fue de 7.8 kg con un crecimiento medio en los últimos 30 años de 6.6%, en ese sentido considerando dicha tasa de crecimiento, se considera que el consumo per cápita mundial aparente de la acuicultura para el año 2009 se habría incrementado entre 8 y 8.5 kg (PRODUCE; 2011)

De acuerdo a las cifras mundiales de acuicultura de la FAO (2011) incluyendo las plantas acuáticas (algas) se muestran a continuación en el cuadro N° 1 los principales países productores en acuicultura en el año 2009. Donde destaca China como el principal productor mundial con su producción anual mayor a 45 mil toneladas métricas.

Cuadro 1: Principales productores mundiales 2009 en acuicultura, incluida la producción de algas. (FAO, 2011)

Nº	PAIS	VOLUMEN (TM)
1	CHINA (Carpa, laminaria, ostión, almeja, tilapia, gracilaria común)	45,279,173
2	INDONESIA (Eucheuma, tilapia, chano, carpa, gracilaria)	4,712,847
3	INDIA (Catla catla, labeo roho, carpa)	3,791,922
4	VIETNAM (Pangasius, ciprinidos, langostino jumbo)	2,589,800
5	FILIPINAS (Cotoni, chano, tilapia)	2,477,392
6	TAILANDIA (Langostino, tilapia, mejillón verde, catfish híbrido)	1,396,020
7	REPÚBLICA DE COREA (Abeto marino, laminaria, lechuga nori, ostión japonés)	1,331,719
8	JAPON (Lechuga nori, vieira japonesa, ostión japonés, medregal)	1,243,339
9	BANGLADESH (Labeo roho, carpa, catla catla)	1,064,285
10	NORUEGA (Salmón del atlántico, trucha arco iris, bacalao del atlántico)	961,840
11	MYANMAR (Labeo roho, tilapia, langostino jumbo, carpas)	778,226
12	CHILE (Salmón del atlántico, chorito, trucha arco iris, salmón plateado, gracilaria)	758,013
-	RESTO DEL MUNDO	6,660,008
TOTAL		73,044,604

Fuente: PRODUCE, 2011

Por otro lado entre las principales especies producidas a nivel mundial tenemos: carpas, tilapias, langostinos, salmónidos, bagres, vieiras y las plantas acuáticas (algas) como son las gracilarias, laminarias y eucheumas (PRODUCE, 2011).

Es importante indicar que en el año 2009 el 91.27% del total de la cosecha de acuicultura mundial incluyendo las plantas acuáticas se concentra en el continente asiático; asimismo el 3.57% se encuentra en las Américas, el 3.4% en Europa, el 1.51% en África y el 0.24% en Oceanía, tal como se observa en el Cuadro N°2. Cabe indicar que las cosechas de América Latina y El Caribe representa el 2.7% de la cosecha de acuicultura mundial (PRODUCE, 2011).

Cuadro 2: Cosecha acuícola por continente en miles de TM 2008- 2009 y su respectiva participación en la acuicultura mundial del año 2009 (PRODUCE 2011)

CONTINENTE	2008	2009	Participación en 2009
ASIA	62,744	66,670	91.27%
EUROPA	2,314	2,485	3.40%
AMERICAS	2,528	2,610	3.57%
ÁFRICA	1,062	1,103	1.51%
OCEANIA	178	176	0.24%
TOTAL	68,825	73,045	100.00%

Fuente: PRODUCE, 2011

Los principales países productores de trucha arco iris a nivel mundial para el año 2010 son en primer lugar Chile con 155,355 TM, Turquía con 90,884 TM, Irán con 88,201 TM, Noruega con 79,857 TM, Italia con 37,352 TM, Francia con 33,121 TM, Dinamarca con 30,910 TM, Alemania con 21,803 TM, España con 18,848 TM, más adelante se encuentran EEUU de Norteamérica con 16,911 TM y China con 16,357 TM entre otros países, encontrándose el Perú con sus 14,250 TM de trucha arco iris en el Puesto N° 12 a nivel mundial (Cuadro N°3) (PRODUCE 2011).

Por otro lado, estrictamente hablando de la región de América Latina y El Caribe; el principal productor de trucha arcoíris es Chile y EEUU de Norteamérica, seguido por nuestro país ubicado en el 3° puesto. (Cuadro N°4) (PRODUCE 2011).

Cuadro 3: Ranking de la producción de trucha a nivel mundial en TM periodos 2009 y 2010.

País	Ambiente de Cultivo	2009	2010	%
Chile	Agua dulce y marina	149,557	161,522	24.39
Noruega	Marina	81,341	87,849	13.27
Irán (Rep. Islámica del)	Agua dulce	67,640	73,052	11.03
Italia	Agua dulce	40,824	44,090	6.66
Francia	Agua dulce	34,852	37,640	5.68
Dinamarca	Agua dulce y marina	33,965	36,682	5.54
Alemania	Agua dulce y salobre	23,765	25,667	3.88
España	Agua dulce	23,190	25,045	3.78
China	Agua dulce	18,118	19,568	2.95
Polonia	Agua dulce	17,844	19,271	2.91
EEUU de Norteamérica	Agua dulce y marina	17,510	18,911	2.86
Perú	Agua dulce	12,817	16,313	2.46
Reino Unido	Agua dulce y marina	14,137	15,268	2.31
Finlandia	Agua dulce y salobre	13,650	14,742	2.23
Islas Feroe	Marina	8,047	8,691	1.31
Japón	Agua dulce	7,335	7,922	1.20
México	Agua dulce	6,065	6,550	0.99
Colombia	Agua dulce	4,986	5,385	0.81
Bosnia y Herzegovina	Agua dulce	4,190	4,526	0.68
Grecia	Agua dulce	3,704	4,001	0.60
Other	Other	27,357	29,546	4.46
TOTAL		610,897	662,239	100

Fuente: PRODUCE, 2011.

Cuadro 4. Producción en Toneladas métricas.de trucha arco iris en el 2010 en la zona americana.

País	Ambiente de Cultivo	2008	2009	2010	%
Chile	Agua dulce y marina	149,411	149,557	161,522	75.25
EEUU de Norteamérica	Agua dulce y marina	16,213	17,510	18,911	8.81
Perú	Agua dulce	12,497	12,817	16,313	7.60
México	Agua dulce	4,698	6,065	6,550	3.05
Colombia	Agua dulce	4,617	4,986	5,385	2.51
Brasil	Agua dulce	2,200	2,376	2,566	1.20
Argentina	Agua dulce	1,600	1,728	1,866	0.87
Costa Rica	Agua dulce	534	577	623	0.29
Panamá	Agua dulce	290	313	338	0.16
Venezuela	Agua dulce	207	224	241	0.11
Bolivia	Agua dulce	194	210	226	0.11
Ecuador	Agua dulce	90	97	105	0.05
TOTAL		192,551	196,460	214,647	100

Fuente: PRODUCE, 2011.

2.1.2 Acuicultura nacional

En base a los registros del Ministerio de la Producción del Perú (PRODUCE, 2011) la acuicultura peruana está orientada principalmente al cultivo de camarones peneidos (*Litopenaneus vannamei*), concha u ostión abanico (*Argopecten purpuratus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis spp.*) siguiendo la tendencia de los principales cultivos que se tiene en la región de América Latina y El Caribe, adicionalmente se cultivan en menor volumen entre otros, algunos peces amazónicos como son el sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*), la gamitana (*Colossoma macropomun*), el paco (*Piaractus brachypomus*), un híbrido derivado de ellos como es la pacotana y viene emergiendo de manera interesante el cultivo de paiche (*Arapaima gigas*). De igual modo, existe una gran variedad de especies con potencial acuícola y con muy buenas perspectivas de mercado, como son la doncella (*Pseudoplatystoma fasciatum*), el dorado (*Brachyplatystoma spp.*), zúngaro (*P. tigrinum*) entre otros peces amazónicos y por otro lado algunos peces de procedencia marina como son el lenguado (*Paralichthys adspersus*), atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), el barrilete (*Katsuwonus pelamis*), la corvina (*Cilus gilberti*), cabrilla (*Paralabrax humeralis*), chita (*Anisotremus scapularis*), entre otros.

La cosecha de nuestra acuicultura nacional en el año 2010 alcanzó poco más de 89 mil toneladas, del cual el 81% representa a las cosechas del ámbito marino y el 19% proviene del ámbito continental. Así mismo, se puede apreciar en el cuadro N° 5 en líneas generales que todos los sistemas de producción acuícola experimentaron un crecimiento notable a partir de 2002, particularmente los principales cultivos (concha de abanico, langostinos y trucha arco iris), aunque la producción de tilapias y de peces amazónicos también crecieron durante este período pero en una menor proporción (PRODUCE, 2011).

Cuadro N°5: Crecimiento de la acuicultura peruana por especie cultivada, periodo 2000-2010.

Ámbito / Especie	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Continental	2,041	2,872	3,231	3,601	6,550	6,586	6,793	9,348	14,986	14,837	17,322
Boquichico	11	7	6	103	82	60	12	15	25	27	36
Cam. de Malasia	10	6	7	8	11	18	11	4	6	11	15
Carachama	-	-	1	0	0	0	0	1	4	1	22
Carpa	6	10	6	0	1	3	11	13	15	15	19
Gamitana	14	20	54	203	241	251	344	414	539	564	680
Paco	26	20	36	9	6	43	38	34	71	75	101
Pacotana	-	-	4	6	3	17	6	86	59	12	3
Paiche	-	-	-	0	2	14	2	-	1	3	48
Tilapia	46	223	122	112	1,326	619	494	1,741	1,714	1,261	2,013
Trucha	1,928	2,586	2,981	3,111	4,699	5,475	5,794	6,997	12,497	12,817	14,250
Sábalo cola roja	-	-	10	45	177	85	78	41	52	49	114
Otros	-	-	4	4	2	1	3	2	3	2	19
Marítimo	4,623	4,667	8,303	10,009	15,564	19,392	21,594	30,183	28,133	29,480	71,701
Concha de Abanico	3,915	3,913	5,701	6,670	10,485	11,065	12,337	18,518	14,802	16,047	58,101
Langostino	614	731	2,593	3,328	5,073	8,324	9,257	11,657	13,314	13,425	13,598
Ostras del Pacífico	16	8	9	11	6	3	-	-	-	-	-
Otros	78	15	-	-	-	-	-	8	17	8	2
TOTAL	6,664	7,539	11,534	13,610	22,114	25,978	28,387	39,531	43,119	44,317	89,021

Fuente: PRODUCE, 2011

Actualmente, existen departamentos que vienen convirtiéndose en las principales zonas de producción acuícola en el país, por sus características ambientales y condiciones para el desarrollo de un buen cultivo de acuicultura y áreas apropiadas, tal es así que se ha caracterizado a Tumbes como la zona de mayor actividad acuícola para la especie langostino; Piura y Ancash para la concha de abanico; San Martín y Piura con la tilapia; Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno se viene caracterizando como las principales zonas para la producción de la trucha y San Martín, Loreto, Ucayali y Madre de Dios para los diversos peces amazónicos como son la gamitana, el paco, el sábalo cola roja, el paiche y el boquichico. (PRODUCE, 2011).

Además, es necesario mencionar que la cosecha acuícola del año 2010 según su nivel de desarrollo, estaría sustentado en empresas de menor escala o de pequeña y mediana empresa y las asociaciones que desarrollan actividades de repoblamiento las cuales en conjunto tienen una participación de 63.14%, el nivel de acuicultura de mayor escala tiene una participación de 36.22% y la acuicultura de subsistencia o de recursos limitados tendrían una participación de apenas 0.64% tal como lo muestra el cuadro N° 6. (PRODUCE, 2011).

Cuadro 6: Participación de los diferentes niveles de desarrollo de la acuicultura peruana, cosecha 2010 (PRODUCE, 2010)

NIVEL DE DESARROLLO	2010	Participación
MAYOR ESCALA	32,241	36.22%
MENOR ESCALA	15,510	17.42%
SUBSISTENCIA	571.8	0.64%
REPOBLAMIENTO	40,698	45.72%
TOTAL	89,021	100.00%

Fuente: PRODUCE, 2011

Para el año 2010, las principales especies comercializadas en el mercado interno en orden de importancia son la trucha arcoíris con poco mas de 12 mil TM (79.87%), tilapia bordeando los 1.4 mil TM (9.23%), gamitana con 680 TM (4.43%), langostino con 407 TM (2.65%), concha de abanico con 208 TM (1.35%) y sábalo cola roja con 114 TM (0.74%), paiche con 48 TM (0.31%) el resto de especies como el boquichico, camarón gigante de malasia, carachama, paco, pacotana, etc. suman 217 TM (1.41%)(PRODUCE, 2011).

Respecto a las exportaciones del 2010 en Toneladas métricas (TM) de las especies de la acuicultura peruana establecidos en los mercados internacionales en orden de importancia son la concha de abanico con 9.98 mil TM (47.61%), langostino con 9.93 mil TM (47.38%), trucha arcoíris con 953 TM (4.55%), tilapia con 94 TM (0.45%) y el paiche con apenas 2 TM (0.01%) (PRODUCE, 2011).

2.1.3 Cultivo de trucha arco iris en el Perú

El cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Perú se realiza en sistemas de estanques de tierra o concreto tipo raceways (pozas) y en jaulas flotantes ya sean metálicas o artesanales (madera y/o troncos de eucalipto) en diversos lagos y lagunas alto-andinas, incluyendo el Lago Titicaca. Los niveles de cultivo de la trucha en el Perú son semi-intensivo e intensivo, extendiéndose en toda la sierra peruana, asimismo la provisión de semilla se encuentra sustentada en la importación de ovas embrionadas provenientes de los EEUU de Norteamérica y Dinamarca (PRODUCE, 2011).

Los principales países de exportación de trucha de nuestro país son Canadá, Estados Unidos, Suecia, Noruega y Alemania realizándose principalmente en dos formas, la de filete y la de trucha entera o HG (sin cabeza, sin vísceras) (PRODUCE, 2011).

2.2 Cambio climático

2.2.1 Definición de Cambio Climático

Según la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) define a este proceso como una variación del clima atribuida directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo comparables (ONU, 1992)

2.2.2 Manifestaciones y Proyecciones del Cambio Climático en el Mundo y en el Perú

Evidencia científica revela que el cambio climático se manifiesta actualmente con aumento en la temperatura de superficie de la tierra y de los océanos, los cambios en los patrones de precipitación, cambios en la frecuencia y la intensidad de la extrema los fenómenos climáticos, la reducción de la criósfera y un aumento del nivel del mar (UNEP, 2010).

La Conferencia sobre Cambio Climático celebrada en Exter-Inglaterra en el 2005 reunió a 200 científicos de 30 países en el Servicio Meteorológico del Reino Unido, donde concluyeron que el fenómeno es mucho más serio de lo que se pensaba. El informe confirma que los ecosistemas muestran los efectos del cambio climático reflejado en las alteraciones del hielo polar, en el deshielo de los glaciares y en las variaciones de los regímenes de lluvia (IGP, 2005).

Para los países de América Latina y el Caribe, los efectos del cambio climático proyectado para el presente siglo será significativa; a pesar del hecho de que las emisiones de gases de efecto invernadero de la región representan el 4% del total de las emisiones globales (UNEP, 2010).

Las proyecciones climáticas para América Latina y el Caribe indican que los aumentos de la temperatura variarán, de acuerdo al particular escenario de emisiones y el país o región que se trate. Se proyecta que hacia el final del siglo (2090-2099), América Latina experimentará un

incremento de temperatura de entre 2°C y 6°C de existir crecimiento económico lento, menos globalización y crecimiento demográfico alto y sostenido (UNEP, 2010).

El Instituto Geofísico del Perú menciona que a nivel mundial el acceso al agua potable se hará más limitado y se incrementará el nivel del mar, provocando que muchas familias pierdan sus hogares debido a que decenas o cientos de metros de costa desaparecerán en los próximos 100 años. Hacia el año 2050 el calentamiento del planeta podría provocar el desplazamiento de más de 150 millones de personas. Serán “refugiados del clima” que huyen de la subida del nivel de las aguas del mar o abandonan las tierras estériles para la agricultura. Es posible que los refugiados ambientales sean el principal problema del siglo XXI, ya que el incremento del nivel del mar desaparecería ciudades enteras (IGP, 2005).

En la Décima Conferencia del Clima de las Naciones Unidas (Buenos Aires-Argentina, 2004) se confirmó que el agua constituye uno de los vehículos principales de impacto del cambio climático. Para el caso de América Latina, los impactos de lluvias torrenciales, tormentas, sequías, desastres hídricos y el desplazamiento de las siembras a zonas menos fértiles ya se sienten en la agricultura, y la disminución en la producción de alimentos es una amenaza constante (IGP, 2005).

El Centro Tyndall de Gran Bretaña en el 2003 ubicó al Perú como el tercer país más vulnerable a los riesgos climáticos del mundo, solo superado por Honduras y Bangladesh (IGP, 2005a); En el 2004 el mismo Centro Tyndall incluyó al país entre los diez países más vulnerables del mundo al cambio climático (MINAM, 2010).

El Perú representó el 0.4% de la emisiones mundiales de Gases de Efecto Invernadero (GEI) en el año 2000. La principal fuente de emisiones de GEI a nivel nacional fue la conversión de bosques y pasturas, atribuida a la deforestación de la Amazonia para cambiar el uso de la tierra con fines agrícolas. La segunda fuente principal es el Transporte; en este caso las emisiones se producen por la baja renovación del parque automotor, malas prácticas de manejo, inadecuada normativa vial, y falta de mantenimiento de los vehículos. La tercera fuente que contribuye al total nacional de emisiones de GEI está representada por la Agricultura, cuya fuente más importante es la fermentación entérica. Debido al poco trabajo de mejoramiento genético y de productividad del ganado, el Perú requiere de mayor cantidad de animales para satisfacer la demanda, y por ende se genera mayor cantidad de emisiones (UNEP, 2010).

En el Perú, desde 1970, ha habido una reducción sustancial de la superficie de los glaciares más pequeños, junto con una significativa pérdida de las reservas de agua dulce durante los últimos 50 años. Así mismo en los países con costas sobre los océanos Pacífico y el Atlántico se observó aumento de las precipitaciones, incluso se anticipa que para el año 2050 efectos negativos sobre la pesca en las zonas costeras de Perú y Chile (UNEP, 2010).

El Ministerio del Ambiente (2010) en la publicación de la Segunda Comunicación Nacional del Perú a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático concluye en lo siguiente:

- En la costa y sierra norte, parte de la sierra central y selva sur, se estiman incrementos de precipitación de hasta 20%; por el contrario, en la selva norte y parte de la sierra central y sur se prevén disminuciones, también de hasta 20%.
- Las lluvias extremas mostrarían un probable decrecimiento en los próximos 30 años en gran parte del territorio.
- Se espera un incremento de temperaturas extremas en gran parte del país tanto en la mínima como en la máxima. El incremento de la temperatura máxima llegaría hasta 1.6°C en promedio (0.53°C/década), mientras que para la mínima el mayor incremento alcanzaría 1.4°C (0.47°C/década). Los mayores incrementos de las temperaturas se presentarían en la costa y sierra norte, en la selva norte y en la sierra central y sur del país.

2.2.3 Cambio Climático: Situación del Valle del Mantaro

La importancia de la cuenca del río Mantaro radica por ser el principal proveedor de alimentos de Lima, capital del Perú, que alberga el 30% de la población del país. Además, la cuenca del Mantaro es el principal centro de generación de energía eléctrica del país, ya que abastece el 37.6% de la demanda del Sistema Eléctrico Interconectado Nacional (MINAM, 2010).

Las poblaciones de la Cuenca del Mantaro son vulnerables a la ocurrencia de eventos climáticos extremos, porque sus principales actividades económicas; la agricultura y la ganadería, dependen de la disponibilidad del agua. En consiguiente fue reconocida como una cuenca piloto, junto con las cuencas de los ríos Piura y Santa, para el estudio del cambio climático y sus impactos por el Consejo Nacional del Ambiente (CONAM, actual Ministerio del Ambiente), como parte de la aplicación de la Estrategia Nacional de Cambio Climático en el Perú, medida adoptada bajo los lineamientos de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC), del cual el país forma parte desde 1992 y del Protocolo de Kioto desde el 2002, y por tanto se alinea al objetivo de “estabilizar la

concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera y evitar llegar a un nivel de interferencia antropógena peligrosa”(MINAM, 2010).

De acuerdo con las observaciones del Instituto Geofísico del Perú, puede dividirse el ciclo lluvioso del cuenca del valle del Mantaro en tres partes: La temporada seca de mediados de abril a agosto; la temporada de inicio de las lluvias de setiembre a diciembre y la temporada de lluvias de enero a marzo. Así mismo, la distribución espacial de lluvias totales anuales no es homogénea en la cuenca. En las partes altas se presentan los valores máximos en el extremo norte y sur occidental de la cuenca (1 000 mm/año), mientras que en la selva alcanzan los 1 600 mm/año. Por el contrario, la zona con menor precipitación se ubica en la parte centro-sur de la cuenca con valores del orden de 550 mm/año (IGP, 2005).

Sin embargo se menciona que las tendencias actuales y los escenarios futuros en la cuenca del Mantaro indican disminución de las precipitaciones y aumento de la temperatura del aire, en aproximadamente 3%/década y 0,24°C/década, respectivamente (IGP, 2005).

En consecuencia, fueron identificados como los principales peligros en la cuenca del Valle del Mantaro, exacerbadas por el efecto del Cambio Climático, para la población humana y sus actividades económicas: las heladas, sequías y los fenómenos geodinámicos externos, tales como deslizamientos, huaycos, erosión de suelos y sedimentación de ríos (IGP, 2005; MINAM, 2010).

2.3 Cambio Climático y Acuicultura

2.3.1 Efectos directos

Los elementos de Cambio Climático que puedan afectar a la acuicultura de manera directa se resumen en los siguientes puntos:

2.3.1.1 Calentamiento global:

Se ha estimado que nuestro planeta se calentará 1.1°C° e incluso podría incrementarse hasta en 3°C° (De Silva y Soto, 2009).

En la acuicultura continental en estanques, los principales factores limitantes determinantes que contribuyen a la temperatura del agua en su interior de estos son la radiación solar, temperatura del aire, velocidad del viento, la humedad, la turbidez del agua y la morfometría del estanque. Sin embargo, en los estanques usados en acuicultura continental de las regiones templadas, el aumento de la temperatura del aire podría reflejarse en un incremento de la temperatura de los estanques generando un impacto en la productividad y en casos extremos, causando mortalidad. Esto debido a que a diferencia de otros animales de granja, todas las especies de animales acuáticos criados para el consumo humano son poiquilotermicas. En consecuencia, cualquier incremento y/o

disminución de la temperatura del hábitat tienen una influencia significativa sobre el metabolismo general y la tasa de crecimiento y por lo tanto sobre producción total, incluso la estacionalidad, la eficacia reproductiva y la resistencia a enfermedades y tóxicos (De Silva y Soto, 2009).

Así mismo, en los cultivos continentales de acuicultura en jaulas el aumento de la temperatura global podría exacerbar la eutrofización (aporte masivo de nutrientes inorgánicos en un ecosistema acuático) y producir una estratificación más pronunciada en los sistemas lénticos. El aumento de la eutrofización podría resultar en el agotamiento del oxígeno en las horas de la madrugada, los cambios repentinos en los patrones del viento y la lluvia podría dar lugar al afloramiento de aguas profundas sin oxígeno hacia la superficie, con efectos adversos sobre las poblaciones de peces de cultivo y silvestres que habitan en el cuerpo de agua (De Silva y Soto, 2009).

2.3.1.2 Cambios en el nivel del mar:

Se ha estimado que los océanos se elevarán diez cm a 100 cm por encima de su nivel actual en este siglo; esto influenciaría profundamente en las regiones delticas por incremento de la intrusión de agua salina provocando grandes cambios bióticos (De Silva y Soto, 2009).

El aumento del nivel del mar en las próximas décadas aumentará la intrusión de la salinidad hacia aguas arriba de los ríos y en consiguiente impactará sobre las prácticas de cultivo en agua dulce de las regiones delticas. En el lado positivo de la acuicultura, las intrusiones de salinidad podrían proporcionar áreas adicionales para la cría de camarones (De Silva y Soto, 2009).

2.3.1.3 Cambio en los vientos y eventos climáticos extremos:

Ocurrencia de eventos climáticos extremos como inundaciones, cambios en los patrones de lluvia monzónica y frecuencia de ocurrencia de tempestades en general (De Silva y Soto, 2009).

La frecuencia de eventos climáticos extremos, como tifones, huracanes e inundaciones inusuales se ha incrementado dramáticamente en las últimas cinco décadas. El número de tales eventos aumentó de 13 entre 1950 y 1960 a 72 de 1990 y 2000. El Niño y La Niña también producen condiciones meteorológicas extremas en las regiones templadas. Por ejemplo, durante El Niño de 1994 a 95 tormentas muy grandes en el sur de Chile dañaron la industria del salmón de manera significativa y dio lugar a un gran número de fugas de peces de cultivo en jaulas marinas. Así mismo, un evento de El Niño también aumenta la severidad de las tormentas de invierno en el norte de América, que puede obstaculizar el desarrollo de la acuicultura a mar abierto. Se sabe también que El Niño induce efectos ecológicos en el ecosistema terrestre con los consiguientes efectos sobre la vegetación y fauna de la tierra y el mar. En conclusión, con la predicción de que el cambio climático probablemente aumente la frecuencia de estos fenómenos podría tener un impacto significativo en la acuicultura costera y oceánica de las regiones templadas, además de los

impactos que están relacionados con los suministros de harina y aceite de pescado. Así mismo, es probable que el cambio climático en algunas regiones del mundo provoque contaminaciones y otros daños de escorrentía procedentes de fuentes terrestres causadas por las inundaciones (De Silva y Soto, 2009).

2.3.1.4 Estrés hídrico(escasez de agua intermitente o localizada):

Se espera que para el 2020 entre 75 a 250 millones de personas africanas estarán bajo estrés hídrico y la disponibilidad de agua dulce en Centroamérica, Sur, Este y Sudeste de Asia, en particular en las cuencas de los ríos más grandes se prevé una disminución. Sudamérica y Europa están en mejores condiciones (De Silva y Soto, 2009).

El calentamiento atmosférico probablemente ocasione cambios en los regímenes hidrológicos de las aguas continentales que podrían afectar las actividades de la acuicultura, tanto en aguas lénticas (mares y lagunas) y lóxicos (ríos). Así mismo, se ha proyectado estrés hídrico, provocado por el cambio climático, que impactara de manera importante en la acuicultura de las regiones tropicales. La tensión prevista se cree que resultara en una disminución de la disponibilidad de agua en los principales ríos del centro, sur, este y sudeste de Asia y África. Además en algunas zonas de los Andes en América del Sur, donde los glaciares están retrocediendo, la disponibilidad de agua se convierte en un problema para los sistemas de acuicultura en pozas que dependen de flujo de agua constante cuando las sequías, impulsados por el cambio del clima, tienen lugar (De Silva y Soto, 2009).

2.3.2 Efectos indirectos:

Los elementos de Cambio Climático que puedan afectar a la acuicultura de manera indirecta se resumen en lo siguiente:

2.3.2.1 Disponibilidad de harina y aceite de pescado:

Se ha estimado que en el año 2003, el sector acuicultura consumió 2.94 millones de toneladas de harina de pescado (53.2% de la producción mundial de harina de pescado) (De Silva y Soto, 2009).

La producción industrial de aceite y harina de pescado se basa generalmente en unas pocas poblaciones de pequeños peces pelágicos de rápido crecimiento y corta vida productiva en las regiones subtropicales y templadas. Las poblaciones principales que contribuyen a la producción del sector son la anchoveta peruana, el capelán, el lanzón, y las sardinas. La influencia de El Niño sobre los desembarques de anchoveta peruana y sardina, por lo tanto sobre la harina de pescado

mundial y los suministros de aceite de pescado y los precios están bien documentados, teniendo en cuenta los efectos amplificados del cambio climático sobre este evento (De Silva y Soto, 2009).

2.3.2.2 Impacto en las enfermedades

Como resultado de los cambios en los océanos provocados por el cambio climático, ha habido un aumento en la tasa de eutrofización en algunos océanos y la presencia asociada de floraciones de algas nocivas, particularmente en el Océano Atlántico Norte y el Mar del Norte. Las floraciones de algas nocivas afectarán la vida marina y la salud humana por el consumo de moluscos filtradores que hayan sido afectados, comúnmente conocidos como la intoxicación por mariscos. Aparte de este impacto, las floraciones de algas nocivas también podrían proporcionar efectos nocivos sobre las operaciones de cultivo en jaulas de salmón (De Silva y Soto, 2009).

Otro efecto asociado al cambio climático son las predicciones de cambios en las poblaciones de parásitos en las regiones templadas y boreales del este de Norte América; por influir en la selección de sus diferentes rasgos de su ciclo vital, afectando la transmisión de los parásitos y potencialmente, su virulencia. Teniendo en cuenta que hay una escasez de conocimientos acerca de los parásitos invertebrados de animales acuáticos distintos de los parásitos nocivos que causan enfermedad en los seres humanos por lo que surge la necesidad de estar al tanto de las amenazas potenciales y nuevos de parasitismo para el sector de la acuicultura (De Silva y Soto, 2009).

Con el aumento de las temperaturas hacia los polos interpuesto por el cambio climático, podríamos ser testigos de la aparición de agentes patógenos que se mantuvieron en jaque por las temperaturas más bajas del invierno y por lo tanto, observar su impacto en los organismos cultivados tales como los moluscos, como por ejemplo la difusión de dos parásitos protozoarios (*Perkinsus marinus* y *Haplosporidium nelsoni*) hacia el norte desde el Golfo de México hasta la bahía de Delaware ha dado lugar a mortalidades masivas en la ostra del este (*Crassostrea virginica*). Otro ejemplo sería la emergencia de un brote de *Vibrio parahaemolyticus* en ostras de Alaska y en todos los productos del mar en el sur de Chile (De Silva y Soto, 2009).

Es evidente que la propagación de enfermedades es una de las amenazas más temidas en la acuicultura. Ejemplos de catástrofes relacionados en la industria de la acuicultura incluyen la propagación de la enfermedad de la mancha blanca en el cultivo de camarón en el Ecuador y otros países de América Latina y más recientemente el caso de Anemia Infecciosa del Salmón, que está afectando seriamente la industria de Salmón del Atlántico en Chile (De Silva y Soto, 2009).

2.4 TRUCHA ARCOIRIS

2.4.1 Clasificación taxonómica

Según datos de FishBase basado en la publicación de Smith G. 1989:

Reino	:	Animalia
Phylum	:	Chordata
Clase	:	Actinopterygii
Orden	:	Salmoniformes
Familia	:	Salmonidae
Género	:	Onchorynchus
Especie	:	<i>Onchorynchus mykiss</i>
Nombre común	:	Trucha arcoíris

Las similitudes en el ciclo de vida la y las características morfológicas entre la trucha arco iris del oeste y la trucha común y salmón del Atlántico del este de los Estados Unidos y Europa llevó a la retención del nombre de *Salmo gairdneri* hasta 1989, año en el que los estudios anatómicos y moleculares demostraron una mayor afinidad entre la trucha arco iris y el salmón del Pacífico (género *Oncorhynchus*) que con la especie salmón del Atlántico (Género *Salmo*) (Linn y Yael, 2008)

2.4.2 Características biológicas:

La forma del cuerpo es alargada y fusiforme con 60-66 vértebras. Presenta una aleta adiposa, por lo general con borde negro. Coloración azul a verde oliva por encima de una banda de color rosa a lo largo de la línea lateral y plata por debajo. Tanto en el dorso como en los flancos, en la cabeza y aletas se encuentran cubiertos de pequeños puntos negros. La Coloración varía con el hábitat, tamaño y condición sexual. Hay una tendencia en truchas de río y reproductores de ser más oscuras y presentar colores más intensos, mientras que las truchas de lago son más brillantes y de color plateado (FAO, 2009).

Pueden soportar una amplia gama de temperatura, desde 0 a 27 ° C, pero en épocas de desove y de crecimiento se ubican en una gama más reducida de 9 a 14 ° C. La temperatura del agua óptima para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 ° C. Como resultado, la temperatura y la disponibilidad de alimentos influyen en el crecimiento y desarrollo, haciendo que el tiempo para alcanzar la madurez varíe, aunque normalmente es de 3-4 años (FAO 2009).

El soporte nutricional y estructural de la poiquilothermia (incapacidad de regulación de la temperatura del cuerpo, por lo que esta varía de acuerdo con la temperatura ambiental, característica fisiológica de los peces) lo constituye el alto grado de Instauración de los Ácidos Grasos (AG), predominantemente la serie omega 3 ($\omega 3$) más que la omega 6 ($\omega 6$) en Truchas Arcoíris. Un régimen lipídico no apropiado repercutirá sobre su sistema inmune y los rendimientos zootécnicos (Kinkelin *et al.*, 1991).

Las hembras son capaces de producir hasta 2 000 huevos /Kg de peso corporal. Los huevos son relativamente grandes en diámetro midiendo de 3 a 7 mm. La mayoría de los peces desovan sólo una vez al año, en la primavera (enero a mayo en el hemisferio norte); aunque la crianza selectiva y el ajuste del fotoperíodo han desarrollado cepas de incubación que puede madurar antes y desovar durante todo el año. También se han obtenido características superiores de selección mediante hibridación, incrementando las tasas de crecimiento, resistencia a las enfermedades, y prolificidad, y mejorando la calidad y sabor de la carne (FAO, 2009).

Las truchas no desovan naturalmente en los sistemas de crianza, por lo que los juveniles se obtienen de zonas de desove artificial en una incubadora o por recolección de huevos de poblaciones silvestres. Las larvas están bien desarrolladas a la eclosión. En la naturaleza, los adultos se alimentan de insectos terrestres y acuáticos, moluscos, crustáceos, huevos de peces y otros pequeños peces, pero lo más importante es la alimentación con camarones de agua dulce, que contiene los pigmentos carotenoides responsables de la coloración naranja-rosa de la carne. En la acuicultura, la inclusión de los pigmentos sintéticos como la astaxantina y cantaxantina en el alimento produce esta coloración (FAO 2009).

2.4.3 Propiedades físico químicas del agua para crianza de Truchas Arcoíris

2.4.3.1 Propiedades físicas

a) Temperatura:

Es un factor físico que juega un papel importante en la presencia del oxígeno, para el proceso fisiológico y metabólico de la trucha. Las temperaturas para las etapas fisiológicas son las siguientes (Godoy, 2002)

- ☐ Temperatura para maduración sexual, reproducción 8-11 °C;
- ☐ Temperatura para incubación, eclosión y larvas 8-10 °C

- ☐ Temperatura para alevinaje 10-15 °C
- ☐ Temperatura para crecimiento 12-17°C

b) Turbidez:

Está dado por la presencia de material en suspensión constituida por sustancias inorgánicas disueltas (arrastradas por precipitaciones, crecidas de río, poluciones de canteras, arenales y minería) o por material orgánico (resto de comida, heces y detritus) presente en el cuerpo de agua. Para incubación de los huevos de salmónidos debe tener menos de 25 mg/L. Para el resto menos de 75 mg/L, ya que 80 mg/L de los sólidos suspendidos provoca la mortalidad de larvas. (Godoy, 2002).

c) Transparencia:

Viene a ser el grado o distancia que recorre el rayo luminoso en el cuerpo del agua, se utiliza el disco de Secchi para ambientes o cuerpos de aguas lénticos. Permite inferir el grado de productividad biológica del ambiente acuático (Godoy, 2002).

2.4.3.2 Propiedades químicas

a) Oxígeno disuelto:

Es el gas disuelto más importante en el agua, se considera un nivel mínimo de 6–9 mg/L para el caso de la Trucha Arcoíris, sin embargo puede llegar a tolerar hasta 2 mg/L por solo unos momentos y si se trata de aguas de abundante caudal (Godoy, 2002).

b) Amoníaco:

Es el principal producto nitrogenado de desecho del metabolismo de los peces excretado principalmente por las branquias, pero también se forma de la descomposición de la materia fecal (De Kinkelin *et al.*, 1991). Se considera niveles menores a 0.02 mg/L y 0.0255 mg/L Para el amonio (forma ionizada del amoníaco) se consideran concentraciones menores a 0.012 mg/L (Godoy, 2002).

c) Potencial hidrogeno:

Es la medida del nivel de iones de Hidrogeno (H⁺) presentes en el agua, está relacionado con la dureza y la capacidad tamponante del agua. El rango óptimo para el caso de las truchas es de 6,5-8,5, es decir, ligeramente alcalino. Fuera de este rango pueden producirse efectos tóxicos

directos y los niveles de estrés serán altos, ocasionando principalmente lesiones en las branquias (Godoy, 2002).

d) Dióxido de carbono:

Este gas se origina en la dilución de la atmósfera, la incorporación de aguas subterráneas, la descomposición de la materia orgánica y como producto residual del proceso respiratorio de los peces y otros organismos. Se considera un nivel de 4 mg/L (Godoy, 2002).

e) Alcalinidad:

Es la medida de la concentración de los iones carbonatos y bicarbonatos en el agua y refleja la capacidad tamponante, es decir, la resistencia al cambio de pH. Es recomendable un rango aceptable de 50 y 200 mg/L (Godoy, 2002).

f) Nitratos:

Estimula la flora acuática en presencia de otros elementos indispensables, aumentando la productividad del agua, sin embargo, cuando esta flora está en exceso se vuelve perjudicial. Los rangos establecidos para el cultivo de truchas indican que no sea mayor a 100 mg/L (Godoy, 2002)..

g) Nitritos:

Son productos intermedios de la degradación biológica de sustancias que contienen nitrógeno orgánico, son solubles en el agua y resultan de la oxidación del amoníaco. Los nitritos pueden inducir la producción de metahemoglobina con la consiguiente hipoxia y cianosis. Los niveles inferiores de la acción toxica son los menores a 0.055 mg/L (Godoy, 2002).

h) Dureza total:

Esta referida a la presencia de ciertas sales compuestas, a partir de carbonatos y bicarbonatos que se asocian con elementos alcalinos como calcio, magnesio, sodio y otros. Su medición se expresa en mg/L de carbonato de calcio. Se recomienda la utilización de aguas con dureza total comprendida entre 80-250 mg/L para el cultivo de truchas (Godoy, 2002).

i) Fosfatos:

Las especies químicas de fósforo más comunes en el agua son los ortofosfatos, los fosfatos condensados (piro-, meta- y polifosfatos) y los fosfatos orgánicos. Estos fosfatos pueden estar

solubles como partículas de detritus o en los cuerpos de los organismos acuáticos. Es común encontrar fosfatos en el agua. Son nutrientes de la vida acuática y limitantes del crecimiento de las plantas. Sin embargo, su presencia está asociada con la eutrofización de las aguas, con problemas de crecimiento de algas indeseables en embalses y lagos, con acumulación de sedimentos, etcétera. La fuente principal de los fosfatos orgánicos son los procesos biológicos por los organismos acuáticos del cuerpo hídrico. Otra fuente importante de fosfatos en las aguas superficiales son las descargas de aguas que contienen como residuo detergentes comerciales (Canepa de Vargas *et al*, 2004).

Cuadro 7: Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza comercial de trucha arcoíris. (Godoy, 2004)

Características	Rango permisible	Rango óptimo
Temperatura (C°)	6-20	10-18
Turbidez (mg/L)	25-75	< 75
pH	7-9	7-8
Oxígeno disuelto (mg/L)	6-10	6-8
CO ₂ (mg/L)	0-4	0-2
NH ₃ (mg/L)	0.01-0.017	< 0.01
Nitritos (mg/L)	0.01-0.05	< 0.01
Alcalinidad (mg/L de CaCO ₃)	30-180	175

Fuente: Talavera, 2008.

2.5 ENFERMEDAD BACTERIANA RENAL

La enfermedad bacteriana renal o denominada también renibacteriosis, cuyas siglas en inglés son BKD (Bacterial kidney Disease), es una patología infecto contagiosa, normalmente de carácter crónico y frecuentemente fatal, que raramente se presenta en peces menores a 6 - 12 meses de edad (Baudin *et al* 1999)

2.5.1. Antecedentes históricos

A inicios de la década de 1930 se describió una enfermedad compleja que afectaba principalmente los riñones de salmones del atlántico (*Salmo salar*) en los ríos Dee y Spey ubicados en Escocia; denominándosele en ese entonces “Enfermedad de Dee”. Pocos años después, en 1935, se reportaron lesiones similares en truchas de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), trucha marrón (*Salmo trutta*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); en criaderos del estado de Massachusetts en los Estados Unidos de Norte América (Wiens and Kaattari, 1999). Pero no fue hasta 1956 que la bacteria causante de la enfermedad fue cultivada (Baudin *et al* 1999).

Se describieron lesiones indicativas de trastornos metabólicos y reacciones contra un agente infeccioso. Además, se encontraron formas bacilares Gram positivas en frotís de riñón, en un principio se clasificó al agente causal dentro del género *Corynebacterium* en función a sus características morfológicas de tinción y a la observación microscópica, sin embargo, la bacteria no pudo reproducirse con las técnicas convencionales, debido a sus notables exigencias para su desarrollo *in vitro*. Finalmente en 1950, se logro aislar usando una modificación del medio Dorset. Posteriormente se cumplieron con los postulados de Koch, inicialmente por inyección con emulsión de órganos internos que contenían la bacteria y después con la bacteria cultivada. La enfermedad fue denominada Enfermedad de “Dee”, enfermedad “White Boil” o “Enfermedad renal de los salmónidos” (Ordal y Earp 1953).

Posteriormente, se desarrollaron trabajos en el departamento de Microbiología de la Universidad del estado de Oregon, Estados unidos de Norte América, que permitieron caracterizar al agente patógeno y clasificar la bacteria en un nuevo género y especie, que es aceptado en la actualidad (Smith *et al*, 2001)

2.5.2. Etiología

2.5.2.1 Morfología celular y características bioquímicas

El agente etiológico de la Enfermedad Bacteriana Renal es el *Renibacterium salmoninarum*, un diplobacilo Gram positivo de tamaño corto (0.3-1.0 por 1.0-1.5 μm), aeróbico, no ácido alcohol resistente, inmóvil y no forma esporas. Se presenta a menudo en pares y a veces se observa en cadenas cortas (Plumb y Hanson, 2011).

Posee una única capa de peptidoglicano, cuyo polisacárido de pared celular comprende más del 60% de su peso. El azúcar principal de su composición está en discrepancia entre galactosa y glucosa, pero también contiene ramnosa, arabinosa manosa, N-acetylfucosamina, y N-acetilglucosamina (Austin y Austin, 2007). Estudios con microscopio electrónico revelaron la presencia de una capsula rodeando al *Renibacterium salmoninarum* (Dubreuil *et al* 1990b) y que estaría compuesto a partir del polisacárido de la pared celular. Además se ha observado que dicha capsula posee fimbrias peritricas compuestas de proteína antigénica P57 (Dubreuil *et al* 1990a), la cual le otorga a la superficie celular la característica hidrofóbica y propiedades hemaglutinantes (Daly y Stevenson, 1987).

Entre sus características bioquímicas tenemos que es incapaz de producir ácidos a partir de azúcares, pero puede degradar Tween (20-60), e hidrolizar caseína, posee catalasa y es oxidasa negativa (Austin y Austin, 2007).

2.5.2.2. Taxonomía

Según el Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI por sus siglas en inglés, el *Renibacterium salmoninarum* se clasifica de la siguiente manera:

Dominio:	Bacteria
Phylum :	Actinobacteria
Clase:	Actinobacteria
Sub Clase :	Actinobacteridae
Orden:	Actinomycetales
Sub orden:	Micrococcineae
Familia:	Micrococcaceae
Género:	Renibacterium
Especie:	<i>Salmoninarum</i>

Se clasifico al *Renibacterium salmoninarum* como miembro de los *Arthrobacter-Micrococcus*, sublínea de los *Actinomicetos*, por comparaciones del ARN ribosomal 16S con diferentes especies de bacterias gram positivas de varios géneros (Stackebrandt *et al* 1988). Las bacterias más cercanas al *Renibacterium salmoninarum* incluyen *Arthrobacter* y *Micrococcus*. Hasta la actualidad, no se han incluido otras especies en el género *Renibacterium* ni han sido identificadas subespecies (Wiens and Kaattari, 1999)

Se identificaron cuatro diferentes secuevares (SV) obtenidas mediante espaciadores intergénicos internos (ITS) del ARN ribosomal 16S-23S; el secuevar dominante altamente conservado, denominado SV1, se presentó en cepas de Canadá, Noruega, Suecia, el Reino Unido y los Estados Unidos; el SV2 se detectó en aislados de Islandia y Japón, el SV3 de Canadá y el SV4 desde Noruega y Escocia (Grayson *et al* 2000).

2.5.2.3. Factores de virulencia

Se ha identificado actividad enzimática del *Renibacterium salmoninarum* que puede contribuir a la virulencia; estos incluyen actividades hemolíticas, proteolíticas, de degradación de ADN, hierro-reductasa, catalasa y exotoxinas. Además ha sido observada mediante microscopia electrónica, una cápsula de 50-100 nm que es considerada un factor de virulencia en otras bacterias. Sin embargo, la evaluación de productos de 10 cepas de diferentes orígenes geográficos, no sugieren alguna actividad hemolítica o citolítica *in vivo* (Wiens and Kaattari, 1999).

La catalasa producida por *R. salmoninarum* es capaz de convertir los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno a oxígeno inofensivo y agua, suprimiendo de esta forma los productos letales liberados por los macrófagos (Campos-Perez et al, 1997)

Se ha identificado genes que codifican hemolisinas de *Renibacterium salmoninarum*(hly, rsh, y rsy).De los cuales se encontró que hly y rsh provocan una respuesta débil de anticuerpos en la trucha arco iris (Grayson et al, 2000).

Los organismos microbianos requieren hierro para su crecimiento y cuando las células son infectadas a menudo reducen la disponibilidad de hierro para afectar la capacidad reproductiva

del patógeno. Sin embargo *R. salmoninarum* produce hierro-reductasa cuando el hierro se agota, dicha enzima permite que el hierro sea disponible para la captación bacteriana (Grayson *et al*, 1995).

Dentro de la actividad proteolítica del *Renibacterium salmoninarum* se han descrito dos proteasas de diferentes pesos, una de 100 kDa y la otra de menor a 20 kDa; la proteasa de mayor peso mostro actividad contra el propio antígeno p57, así como contra albumina sérica bovina desnaturalizada y sustratos de ovoalbúmina de gallina. Sin embargo aún no se ha establecido el rol directo de estas proteasas en la virulencia (Wiens and Kaattari, 1999).

Estudios sugieren que cambios patológicos en peces infectados también están relacionados con la secreción *in vivo* de una toxina. Se observó un acumulo de eritrocitos en el bazo de trucha arcoíris infectadas experimentalmente sugiriéndose que una toxina pudo haber dañado los eritrocitos, resultando en su secuestro en el bazo. Adicionalmente, la ausencia de células bacterianas en la histopatología de cerebro de bacalao negro (*Anoplopoma fimbria*) infectados que desarrollaron meningitis sugieren la presencia de una toxina (Wiens and Kaattari, 1999).

Las proteínas de superficie del *Renibacterium salmoninarum* suprimen la respuesta específica por anticuerpos, esta supresión es atribuida a la p57, pero también a una proteína de superficie de 22 kDa ((Wiens and Kaattari, 1999)

2.5.2.4 La proteína 57/58 kDa

La proteína más caracterizada producida por el *Renibacterium salmoninarum* es la proteína de 57/58 kDa (p57), esta proteína es un antígeno inmunodominante la cual es secretada y está presente en la superficie celular bacteriana. Esta proteína, así mismo, puede ser extraída por lavado celular en un pH ácido o ser concentrada a partir del sobrenadante de cultivo (Wiens y Kaattari, 1999). Así mismo, se ha demostrado que la p57 es inestable y susceptible a la degradación mientras está ligada a la superficie celular bacteriana, secretada en el cultivo o secretada durante la infección (Wiens y Kaattari, 1999). Sin embargo es estable al calor-(100 ° C durante 30 min y representa el 60-70% de proteína de la superficie de la célula (Wood and Kaattari, 1996). Basado en el análisis de secuencias génicas la proteína P57 consta de 557 aminoácidos y es rica en glicina, valina, triptófano, alanina y serina, 38% de los aminoácidos son hidrofóbicos, posiblemente contribuyendo a la naturaleza hidrofóbica de las células de *Renibacterium salmoninarum*, por otro lado las fimbrias son a menudo hidrofóbicas y se ha sugerido que fimbrias peritricas cortas del *Renibacterium salmoninarum* observadas bajo microscopia electrónica pueden estar compuestas de p57 (Wiens y Kaattari, 1999).

Tanto en cepas virulentas y atenuadas exhiben p57 en el sobrenadante de cultivos en un grado similar, pero son las cepas atenuadas las que no fueron capaces de propagarse en el riñón posiblemente debido a los niveles reducidos de virulencia de la P57 asociada a la cepa atenuada. (O'Farrell *et al*, 2000). Sin embargo, la proteína P57 está codificada por genes duplicados (msa1 y msa2) con secuencias idénticas y hay evidencia de que estos dos genes son necesarios para la patogenicidad completa de *R. salmoninarum* (Coady *et al*, 2006).

La proteína P57 interfiere con el desarrollo de la respuesta inmune normal y suprime la producción de intermediarios de la explosión respiratoria y anticuerpos (Grayson *et al* 2000). Además, ha sido asociada con una serie de actividades biológicas *in vitro*, que pueden ser responsables de algunas patologías observadas, entre estas actividades se encuentran la aglutinación de eritrocitos de mamíferos, aglutinación de espermatozoides y leucocitos de salmónidos y supresión no específica de respuesta de anticuerpos en salmónidos (Wiens y Kaattari, 1999).

2.5.2.5. Características de cultivo del *Renibacterium salmoninarum*

Al *Renibacterium salmoninarum* se le considera una bacteria “fastidiosa” debido a su lento desarrollo *in vitro* demorando entre dos a tres semanas a lo menos, en cultivos primarios, para producir colonias visibles macroscópicamente (Sanders y Fryer 1980). Se ha descrito como tiempo máximo para desarrollar colonias hasta 8 y 12 semanas de incubación en medios KDM2 y SKDM2 respectivamente; el mayor tiempo reportado de crecimiento en cultivo primario en medio SKDM2 fue de 19 semanas post inoculación de muestra de riñón (Benediktsdóttir *et al* 1991). Su crecimiento es aeróbico y su temperatura de incubación óptima es de 15°C a 18°C, crece lentamente a 5°C y 22°C y no desarrolla a partir de 30°C, así mismo el tiempo de generación durante la fase logarítmica de crecimiento es de aproximadamente 24 horas (Woo y Bruno, 1999).

En el medio KDM2, se describen colonias con un color que va desde el blanco hasta un tono cremoso amarillento, son de forma circular y de superficie convexa, de tamaño pequeño pero variable que va desde un puntilleo hasta unos 2 mm de diámetro; son brillantes, lisas, de bordes definidos y no producen endopigmentos ni exopigmentos (Smith P *et al* 2001). También ha sido reportado un crecimiento atípico del *Renibacterium salmoninarum* en infecciones subclínicas, describiéndose colonias a manera de una capa fina en la superficie del agar, sin formar colonias separadas; este crecimiento atípico se presentó en el medio KDM2 mas no en el

SKDM2, este hecho puede explicar algunas de las fallas en el cultivo, cuando solo se usa el medio SKDM2 para la detección de enfermedad bacteriana renal en peces infectados subclínicamente (Hirvelä-Koski *et al* 2005).

2.5.3 Epidemiología

2.5.3.1 Hospederos y distribución geográfica

La enfermedad bacteriana renal se ha descrito solamente en peces salmónidos, dentro de los cuales los géneros *Oncorhynchus*, *Salmo* y *Salvelinus* parecen ser los principales hospederos (Fryer y Sanders, 1981). Sin embargo, se han documentado infecciones naturales en el salmón del Danubio (*Hucho hucho*) y Tímalo (*Thymallus thymallus*) (Pfeil-Putzien *et al*, 1985; Kettler *et al*, 1986). Infecciones experimentales involucradas con mortalidad se llevaron a cabo en especies no salmónidos como el pez sable (*Anoplopoma fimbria*), vieira (*Patinopecten yessoensis*), Chato índico (*Platycephalus indicus*) y sculpin japonés (*Cottus japonicus*) (Sakai y Kobayashi, 1992). Así mismo el *Renibacterium salmoninarum* ha sido aislado en lamprea marina (*Petromyzon marinus*) en el lago Ontario (Eissa *et al*, 2006).

Los informes sobre el alcance geográfico de BKD tienen su origen en países que poseen una población de salmónidos susceptibles tales como Canadá, Chile, Japón, Estados Unidos Europa continental, Escocia y Escandinavia. A esta lista se les une el Perú con los informes de Talavera (2008), y Arauco (2010).

2.5.3.2 Susceptibilidad

Una serie de observaciones indican que las especies de salmónidos pueden diferir en su susceptibilidad al BKD en infecciones experimentales, dependiendo de la especie hospedera y a la virulencia de la cepa (Suzumoto *et al*, 1977; Winter *et al*, 1980; Evenden *et al*, 1993, Starliper *et al* 1997). La patogénesis y mortalidad en conexión con la enfermedad bacteriana renal es afectada también por las condiciones del medio como la temperatura, salinidad, estrés y la dieta que se brinda a los peces (Sanders *et al*, 1978; Fryer y Sanders, 1981; Mesa *et al*, 1998).

Dentro de los salmónidos, los provenientes de la cuenca del Pacífico, es decir el género *Oncorhynchus*, son los más susceptibles (Smith P *et al*, 2001). El salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*), salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) y salmón Chinook o Real (*Oncorhynchus tshawytscha*) son las especies más sensibles demostradas por infecciones más agresivas y con mortalidades más altas. Los salmones del atlántico (*Salmo salar*) y la trucha marrón (*Salmo trutta*) son bastante resistentes, mientras que a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se le considera relativamente resistente (Sakai *et al*, 1991; Dale *et al*, 1997; Starliper *et al* 1997). Además, se reporta que la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) es más susceptible a infección

natural y experimental por *Renibacterium salmoninarum* que la trucha arcoíris, trucha marrón y otros salmónidos (Eissa, 2005).

A pesar que BKD ocurre principalmente en los cultivos de agua dulce, una mortalidad significativa se produce también en los cultivos de agua salada. Como una consecuencia de la infección, los salmónidos anádromos juveniles (Smolts) son incapaces de aclimatarse al agua de mar y mueren. Se ha reportado mortalidad de los smolts de salmón coho infectados de 17,2% en agua dulce y el 4% en agua salada. Incluso si los salmónes están ligeramente infectados al entrar en agua salada, la enfermedad sigue el progreso y la mortalidad se produce. (Baudin et al, 1999).

2.5.3.3 Prevalencia

En el Perú los estudios sobre BKD aún son escasos. El último estudio publicado hasta la fecha de publicación de este trabajo fue el de Arauco (2010) quien señala una frecuencia de *Renibacterium salmoninarum* 5.79% (de 121 peces muestreados) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). A comparación de Chile quien mediante su Programa de Vigilancia Epidemiológica, cuyos datos son actualizados anualmente, muestra una prevalencia oficial de *Renibacterium salmoninarum* 0.15% para el año 2010 (Sernapesca, 2011), también en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

2.5.4 Transmisión de la enfermedad

2.5.4.1 Transmisión horizontal y vertical

Horizontalmente, los peces se pueden infectar por la ruta oral y también por erosiones de la piel. La fuente de infección puede ser alimento contaminado, agua contaminada, aunque el patógeno no sobrevive bien fuera del hospedero y también peces enfermos o inaparentemente infectados (Baudin et al, 1999).

La transmisión vertical del *Renibacterium salmoninarum* vía ovas ha sido demostrada por diversos autores y en varias maneras, incluso con la desinfección de las ovas por 15 minutos en 250 ppm de solución yodada, no se previene la transmisión vertical. Así mismo, la transmisión a través del esperma juega un rol importante en la transmisión vertical del *Renibacterium salmoninarum* (Baudin et al, 1999).

El patógeno se puede localizar dentro de las ovas, esto ocurre cuando los huevos sin contaminar son inmersos antes de la fertilización en fluido celómico contaminado (Evelyn et al, 1986b). Es así que, una alta incidencia de infección *intraovum* y la subsecuente infección de

salmónidos juveniles, se correlaciona con la presencia de la bacteria en el fluido celómico, incluso en pequeñas cantidades (Lee y Evelyn, 1994).

2.5.4.2 Transmisión por portadores y vectores

Todos los salmónidos pueden actuar como portadores, aunque con marcadas diferencias respecto a la eficiencia de la transmisión. La trucha arco iris es la especie de salmónido más refractaria a BKD. Parece poco probable que el agente pueda multiplicarse en los no salmónidos, sin embargo se menciona en la literatura algunos peces: el arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*), la perca shiner (*Cymatogaster aggregata*), el greenling (*Hexagrammosotakii*) y el flathead (*Platycephalus indicus*) (Baudin *et al*, 1999).

Los moluscos bivalvos que residen alrededor de las jaulas marinas son capaces de ingerir y destruir patógenos bacterianos como *R. salmoninarum* sin ser ellos mismos afectados, sin embargo, es poco probable que eliminen todos los patógenos de todo un criadero de peces. La vieira japonesa (*Patinopecten yessoensis*), por ejemplo ha sido mencionado en la literatura como un vector posible (Baudin *et al*, 1999).

También se ha postulado que los piojos del salmón (*Lepeophtheirus salmonis*)-como otros ectoparásitos chupasangre pueden actuar como vectores de *R. salmoninarum*. Los piojos de vez en cuando pueden ser portadores del agente pero hasta ahora no hay evidencia de transmisión activa de BKD causada por los piojos del salmón registradas en la literatura, como ocurre por ejemplo con la transmisión activa del virus de la viremia primaveral de la carpa por los piojos en agua dulce. Por otra parte, el piojo del salmón rara vez cambia su huésped, a menos que encuentre un pez mucho más débil o herido (Baudin *et al*, 1999).

Parece que la bacteria puede ser transmitida por las aves y mamíferos como un contaminante externo. Sin embargo, a temperatura ambiente, que es aproximadamente la temperatura de superficie de las aves, la bacteria sobrevive poco (a 25 ° C en medio de cultivo KDM, el 97% de viabilidad se pierde después de 71 horas). Sin embargo, la transmisión mecánica de otros patógenos entre piscigranjas por medio de las aves ha sido descrita, aunque no hay pruebas concretas de que esto ocurra en BKD, podría ser posible (Baudin *et al*, 1999).

2.5.5. Reservorios

Los principales reservorios de infección son los salmónidos infectados. Todos los salmónidos portadores con infección subclínica o latente pueden servir como reservorio de la infección. Además, se ha informado la supervivencia del patógeno por hasta 21 días en las heces y en los sedimentos de estanques (Baudin *et al*, 1999).

2.5.6 Periodo de incubación, signos clínicos y lesiones

2.5.6.1 Periodo de incubación

La duración del período de incubación es generalmente largo (de hasta varios meses, incluso años). Rara vez se manifiesta en peces, hasta que estén al menos dentro de los 6-12 meses de edad. La duración depende de: factores ambientales como la temperatura, características del hospedero y de la cepa bacteriana. Después de la infección los signos clínicos pueden no ser evidentes durante un período considerable (Baudin *et al*, 1999).

2.5.6.2. Signos clínicos

Incluso en peces con infección grave de *Renibacterium salmoninarum* pueden no manifestar signos externos (Baudin *et al* 1999; OIE 2006). Generalmente no se expresa en peces de muy corta edad, dado que es de curso crónico. Cuando se presenta un brote, los cambios de comportamiento pueden variar según la especie y edad del pez, afectando funciones de relación representados por el movimiento errático, letargia y pérdida de apetito, también se observa oscurecimiento de la piel especialmente en la zona dorsal, exoftalmia, yagas en la piel y distensión abdominal (Fryer y Sander 1981; Smith P *et al* 2001).

2.5.6.3 Lesiones macroscópicas externas e internas

Peces gravemente infectados con el agente pueden no mostrar lesiones externas evidentes, así como también mostrar uno o más de los siguientes: branquias pálidas indicativos de anemia, exoftalmia (por un desorden hídrico), distensión abdominal (debido a la acumulación de líquido ascítico), ampollas de la piel llena de líquido

transparente o turbia, úlceras superficiales, hemorragias (especialmente alrededor del poro anal) y, con poca frecuencia, cavidades intramusculares, lleno de material caseoso-sanguinolento o necrótico. También, líquido turbio se puede obtener a partir de las cavidades abdominal y pericárdico, las hemorragias se observan en las paredes de la cavidad abdominal y en las vísceras, una capa de fibrina puede cubrir uno o más de los órganos viscerales, y lo más característico, lesiones granulomatosas de color blanco cremoso se desarrollan en el riñón y, con menor frecuencia, en el bazo y el hígado. Curiosamente, estas últimas lesiones pueden estar bien encapsuladas e incluso pueden estar reabsorbidas en especies como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), que parecen ser bastante resistentes a BKD. A diferencia del salmón del Pacífico, especie más susceptible (Género *Oncorhynchus*), los granulomas rara vez se encapsulan (Baudin *et al*, 1999).

2.5.6.4 Lesiones microscópica:

Histológicamente, las lesiones son granulomas crónicos, observándose principalmente en el tejido hematopoyético (Región craneal de los riñones), pero que se extiende al hígado, los músculos cardíaco y esquelético y prácticamente a cualquier órgano en la etapa final de la enfermedad. Histológicamente los granulomas contienen un núcleo necrótico rodeado por células epitelioides y linfocitos infiltrantes. La presencia de una cápsula fibrosa es variable y la falta de encapsulación se asocia a menudo con infecciones más agresivas o especies más susceptibles (Baudin *et al*, 1999).

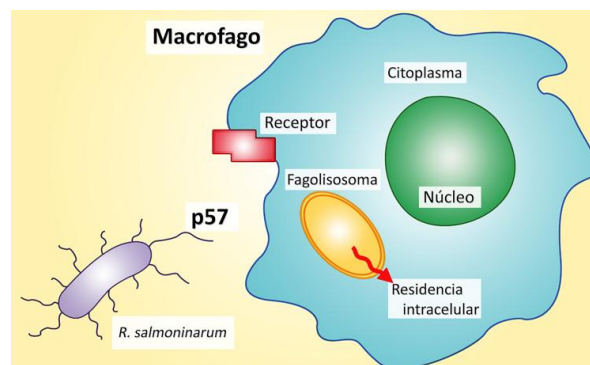
2.5.7 Patogénesis.

Respecto de las rutas de ingreso que emplea el *Renibacterium salmoninarum* para acceder a los tejidos internos de los peces, se cree que son través de las branquias y por la vía gastrointestinal, además de la infección de las ovas que es muy importante (Smith P 2000). Se estima que este microorganismo puede ingresar a través del epitelio branquial, debido a que los peces adquieren infecciones sistémicas con esta bacteria luego de bañarlos con suspensiones de *Renibacterium salmoninarum*, así mismo, los salmones adquieren fácilmente la enfermedad si son alimentados con materiales infectados con esta bacteria (Fryer y Sander 1981; Smith P 2000).

Una vez que supera las barreras superficiales, el *Renibacterium salmoninarum* tiene la capacidad de inducir su absorción por parte de células no fagocíticas y pueden sobrevivir la ingestión, esto proporciona un medio de entrada en el hospedero a través de tracto

gastrointestinal; luego la diseminación ocurre a través de la circulación sanguínea en forma libre y también incorporada dentro de fagocitos, principalmente monocitos, así como de células no fagocíticas (Bruno 1986b, Gutenberger *et al*, 1997). La capacidad de estas bacterias para resistir las actividades séricas y fagocíticas que se presentan en la circulación sanguínea, como parte de los mecanismos defensivos de los peces, son características importantes para el éxito en esta etapa de diseminación del proceso infeccioso, se sabe que el *Renibacterium salmoninarum* sobrevive *in vivo* y se multiplica dentro de fagocitos (Smith P *et al*, 2001). Las características únicas de su pared celular pueden contribuir a su resistencia a la acción fagocítica, así como la proteína p57 que inhibe la explosión respiratoria que tiene lugar en los fagolisosomas de los macrófagos y también suprime la producción de anticuerpos. Al estudiar las infecciones intracelulares del *Renibacterium salmoninarum*, se ha observado que muchas de estas bacterias son capaces de escapar del fagosoma previo a la formación del fagolisosoma, para entonces localizarse en el citoplasma de los fagocitos y de este modo, evaden la acción bacteriolítica que tiene lugar en el fagolisosoma tal como se ilustra en la Figura N°1 (Gutenberger *et al*, 1997; Smith P 2000).

Figura 1: Modelo de un posible mecanismo de acción de la p57.



Fuente: Woo y Bruno (1999)

La invasión celular es promovida por la función de la p57, cuya composición hidrofóbica, estructura filamentosa y capacidad de unirse a leucocitos de peces, puede causar que las bacterias se adhieran a tipos celulares específicos (Woo y Bruno 1999).

Se caracterizaron los cambios histopatológicos que ocurren después de inoculación intraperitoneal de *Renibacterium salmoninarum* vivo o fijados con formalina a truchas arcoíris. Dentro de los 45 minutos de la inoculación, las células bacterianas se encontraron en los fagocitos del riñón y el bazo. Después de 4-6 días, se observaron bacterias diseminadas

extracelularmente a través de estos órganos y, por 6-10 días, un gran número de *Renibacterium salmoninarum* estaban en monocitos sanguíneos y macrófagos, donde aparentemente se habían multiplicado. A los 14 días, las células fagocíticas que contenían al *Renibacterium salmoninarum* estaban entre los haces de miocardio en el corazón. Después de 28 días, las bacterias se encontraron intracelularmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos glomerulares y el lumen de los túbulos colectores, pero no dentro de los túbulos proximales (Bruno 1986b).

El tejido hematopoyético de la parte anterior del riñón es afectado inicialmente, seguido de grandes daños al cuerpo renal conformado principalmente por tejido excretor y parte del hematopoyético (Jansson 2002).

La colonización de los tejidos de riñón y reacciones mediadas por células del *Renibacterium salmoninarum*, probablemente resulta en el desarrollo de lesiones granulomatosas, una reacción común a los patógenos intracelulares (Woo y Bruno 1999). Numerosos investigadores han observado al *Renibacterium salmoninarum* dentro de las células fagocíticas, aunque la evidencia concluyente de la replicación intracelular ha sido difícil de corroborar (Bruno 1986b). La evidencia preliminar sugiere que el *Renibacterium salmoninarum* es capaz de escapar del fagosoma de macrófagos al citoplasma celular (Gutenberger *et al*, 1991). Esto apunta a que el *Renibacterium salmoninarum* es un organismo invasor capaz de causar una infección diseminada (Woo y Bruno 1999).

Dado que la p57 se encuentra en grandes concentraciones en el suero de peces infectados experimental y naturalmente, es posible que la inmunidad humoral a la p57 pueda dar lugar a la formación de complejos inmunes y subsecuentes reacciones de hipersensibilidad en los glomérulos del riñón (Rockey *et al*, 1991). Se vieron depósitos subendoteliales denso-eléctricos semejantes a los complejos inmunes en los peces infectados experimental y naturalmente (Young y Chapman, 1978). Estos complejos inmunes están básicamente formados por anticuerpos ligados a la proteína p57, que ocasionarían glomerulonefritis (Kaattari, 2000).

La respuesta por parte del hospedero progresa de manera discreta, formando granulomas rodeado de células epitelioides y células linfoides que luego se amplía masivamente (Smith P *et al*, 2001; Jansson 2002), además existe la presencia de células gigantes y aumento de centros melanomacrófagos (Bruno 1986b). A temperaturas bajo 9°C, se acompaña de pseudomembranas de fibrina y leucocitos alrededor de órganos internos (Smith IW 1964; Ferguson 2006), usualmente hay una encapsulación más pronunciada que de las lesiones en

especies resistentes (Evelyn 1993) y a temperaturas superiores las lesiones son de naturaleza necrótica (Smith IW 1964). La enfermedad clínica se desarrolla durante los momentos de estrés (Noga 2010) ocasionando infección renal, septicemia y muerte del pez afectado (Bruno *et al*, 1997).

La infección de las ovas, responsable de la transmisión vertical, por lo general se origina de la infección del fluido celómico con el *Renibacterium salmoninarum* en las hembras reproductoras, sin embargo se ha demostrado que infecciones dentro del óvulo y de la progenie pueden ocurrir antes de la ovulación y directamente desde el tejido ovárico (Evelyn 1993). El patógeno encuentra su camino a la yema a través del micrópilo durante el proceso de picnocirosis. Además; se ha detectado *R. salmoninarum* en el semen de poblaciones de cultivo de truchas infectados, lo que sugiere que los machos infectados también podrían desempeñar un papel en la transmisión y propagación de la renibacteriosis (Eissa y Elsayed, 2006).

2.5.8. Factores ambientales involucrados en el desarrollo de la enfermedad

2.5.8.1 Efectos de la temperatura y la dureza del agua

BKD es una infección de desarrollo lento que puede causar la mortalidad en una amplia gama de temperaturas de agua. Sin embargo, el comienzo y la magnitud de la mortalidad además de depender de la temperatura, pueden variar de acuerdo a la especie involucrada (Sanders, y Fryer 1980). Así tenemos en un estudio donde se evaluó siete niveles de temperatura, que van desde 4 ° C a 20,5 ° C, encontrándose que la mortalidad de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) fue mayor a 6,7 ° C, 9,4 ° C y 12,2 ° C, pero en el Salmón rojo era casi 100% en cualquier temperatura del agua dentro del rango de 6,7 ° C a 20,5 ° C. Así mismo, Sanders y Fryer (1980) indicaron que la mayoría de las epizootias en los Estados Unidos de Norteamérica, se produjeron durante el otoño y el invierno, en condiciones de disminución de temperatura del agua, sin embargo la mayor mortalidad se asoció con los períodos de temperaturas altas de agua. Además, se observó que durante los períodos de bajas temperaturas del agua la enfermedad producía una tasa baja pero continua de mortalidad. Por otro lado según diversos informes, los brotes clínicos más graves se produjeron en agua blanda sin embargo, esto no se ha podido reproducir en los laboratorios, por otro lado se ha planteado la sospecha de que el contenido mineral del agua en lugar de la dureza del agua por sí sola puede ser importante para determinar la prevalencia de la BKD. (Baudin *et al*, 1999).

2.5.8.2 Efectos de la dieta

El agotamiento del ascorbato (forma iónica del ácido ascórbico) era sospechoso de ser responsable de un aumento en la incidencia de la renibacteriosis. Desde entonces, varios estudios concluyeron que las vitaminas no tienen ningún efecto sobre la incidencia. Observaciones más arcaicas señalaban también que las tasas de mortalidad fueron mayores en los peces alimentados con dietas secas en lugar de húmedas, pero estas observaciones no han sido confirmadas por otros investigadores (Baudin et al, 1999).

Se ha demostrado una reducción de las infecciones BKD por la alimentación de salmones Chinook a base de una dieta que contenga altos niveles de yodo ($10.1\mu\text{g} / \text{g}$). Así mismo se observó un nivel de infección considerablemente menor en el salmón del Atlántico alimentado con una dieta alta en elementos de traza (Fe, Cu, Mn, Co, I y F) en comparación con otros seis tipos de dieta. Más tarde se compararon una dieta rica en yodo ($4.5 \text{ g} / \text{g}$) y flúor ($4.5\mu\text{g} / \text{g}$) con un alimento comercial, y otros cinco tipos de dietas, observándose una menor prevalencia de clínica BKD (3,6%) en comparación con el comercial (34%) y el experimental, otros cinco dietas (15-24%). (Baudin et al, 1999).

2.5.9 Diagnóstico

El diagnóstico se debe iniciar en casi todos los casos mediante la obtención y análisis de los antecedentes anamnésticos, seguido de la observación de los signos y síntomas clínicos y de la patología macroscópica de los peces. Las tinciones de Gram y PAS desde frotis o cortes de tejidos con lesiones son muy útiles, en especial la primera, para complementar el diagnóstico, en conjunto con el análisis histopatológico y la identificación mediante pruebas serológicas de la bacteria. Cuando hay consistencia en los resultados de los exámenes recién mencionados, se considera suficiente evidencia como para dar por confirmado el diagnóstico presuntivo de la enfermedad (Smith P, 2001).

Dado que el riñón es el principal blanco y de mayor frecuencia para BKD, resulta ser el mejor órgano para el muestreo durante las epidemias (Noga, 2010; Smith P, 2001).

El *Renibacterium salmoninarum* es inactivo a pruebas bioquímicas convencionales basadas en la utilización de diferentes carbohidratos para su crecimiento. El test API ZYM ha mostrado ser adecuado para la identificación del agente de la enfermedad renal, en razón a que es un test

enzimático que no requiere la propagación de la bacteria (Goodfellow *et al* 1985; Austin y Austin 1987). También ha sido descrita una fuerte reacción catalasa positiva, oxidasa negativa y actividad proteolítica lenta (Goodfellow *et al* 1985). La bacteria es β hemolítica pero la actividad declina después de un tiempo prolongado de cultivo (Bruno y Munro 1986b).

2.5.9.1 Diagnostico diferencial

Se debe diferenciar de otros bacilos Gram positivos especialmente *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus piscium* y *Vagococcus salmoninarum*; estas tres especies tienen gran similitud entre sus patrones bioquímicos, originalmente se les clasificó como lactobacilos y se les asoció como agentes causales de la “pseudoenfermedad del riñón”, son básicamente bacterias oportunistas y tienen una baja virulencia (Smith P, 2001). La diferenciación se basa principalmente en la observación y detección del organismo o de sus antígenos mediante Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica, ELISA y PCR (Eissa y Elsayed, 2006)

En relación a las lesiones nodulares granulomatosas, se debe tener en cuenta que este tipo de alteraciones pueden ser generadas por otros microorganismos, ya sean bacterianos (*Mycobacterium spp*, *Nocardia spp*), micóticos (*Ichthyophonus hoferi*, *Exophiala salmonis*) o parasitarios (*Enfermedad Proliferativa del Riñón*, *Ceratomyxa shasta*, metazoos enquistados) e incluso como reacción a materiales extraños particulados como por ejemplo componentes oleosos de los adyuvantes de las vacunas en salmones (Smith P, 2001).

La morfología y las propiedades tintoriales de las bacterias presentes en los focos de las lesiones permiten una orientación más segura en el diagnostico; un ejemplo es la coloración “Gram” para renibacteriosis, tinción Ziehl-Nielsen – ácido alcohol resistentes para tuberculosis, formaciones pseudomicelarias de *Nocardia*, coloración Hematoxilina y Eosina para esporas de *Ichthyophonus hoferi* (Kinkelin *et al*, 1991)

Por otra parte, en peces expuestos a niveles superiores a 5mg/l de dióxido de carbono en el agua y una dieta baja en minerales con menos de 0.1% de magnesio, se produce una deposición de sales cálcicas en los uréteres, lo que origina nefrocalcinosis, respuesta granulomatosa de textura arenosa o urolitiasis, donde se producen lesiones renales, que a nivel macroscópico podrían confundirse también con BKD (Smith P, 2001; Peddie, 2004; Ferguson, 2006).

2.5.9.2. Pruebas diagnosticas

A) Aislamiento e identificación bacteriológica del agente

Un número de medios de cultivo se han utilizado con éxito para el aislamiento primario de *R. salmoninarum* a partir de peces infectados clínicamente. Entre ellos medio de agar sangre-cisteína (Ordal y Earp, 1956), KDM2 (Evelyn et al, 1977), SKDM (Austin *et al*, 1987) y medio de agar carbón (Daly y Stevenson, 1985) se utilizaron con diversos grados de éxito. El inconveniente más común de cultivo bacteriano es la naturaleza de crecimiento lento del *R. salmoninarum*, que requiere un máximo de 12 semanas para lograr el crecimiento bacteriano. Más recientemente, Eissa (2005) ha sugerido un medio KDM modificado (MKDM), que mejora el crecimiento de *R. salmoninarum*, al reducir al mínimo otros contaminantes bacterianos y en última instancia, acortar el tiempo de incubación de 5-10 días. La temperatura de incubación óptimo para el aislamiento de *R. salmoninarum* los medios de cultivo es de 15 ° C (Sanders y Fryer, 1980). El organismo se diferencia de otras bacterias Gram-positivas con las características morfológicas y químicas descritas por Sanders y Fryer (1980).

B) Detección e identificación del antígeno

La "homogeneidad" antigénica del *R. salmoninarum* ha sido generalmente considerada como una característica que favorece el uso de antisueros específicos en los procedimientos de identificación, esto se explica por la existencia de factores antigénicos estables al calor, liberado en abundancia en los tejidos infectados, de los cuales el más importante es la denominada la proteína p57 (Baudin *et al*, 1999).

Tanto antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales puede ser fácilmente obtenidos por la inmunización de conejos con los preparados de *R. salmoninarum*, de preferencia purificada. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de estos antisueros para los procedimientos de inmunodiagnóstico puede dar falsas reacciones positivas (Bandín *et al*, 1993). Los anticuerpos monoclonales (Acm) también han sido producidos por una serie de laboratorios y, algunos de estos Acm se utilizan actualmente en los kits de ELISA disponibles comercialmente. Tanto los sueros policlonales, y Acm de *R. salmoninarum* ahora pueden obtenerse de fuentes comerciales (Baudin *et al*, 1999).

Entre las pruebas basadas en estos conceptos tenemos:

- a) **Prueba de aglutinación:** fácil y rápido de realizar sin embargo su sensibilidad es baja (Baudin *et al*, 1999; OIE, 2006)
- b) **Pruebas de inmunofluorescencia (IF) de anticuerpo directa e indirecta o FAT por sus siglas en inglés (Fluorescent antibody test):** han sido comúnmente utilizadas para demostrar la presencia de *R. salmoninarum* en los tejidos infectados incluyendo tejidos fijos y con parafina (Baudin *et al*, 1999; Smith P, 2001). El primer reporte de BKD en Perú, mediante inmunofluorescencia indirecta en tejido renal de trucha arcoíris, lo realizó Talavera (2008), el cual confirmó la infección de este agente de los hallazgos tanto macroscópicos como microscópicos de granulomas renales.
- c) **Ensayo Inmunoabsorbente directo ligado a enzimas (ELISA):** El ELISA es ampliamente utilizado para la detección de *R. salmoninarum* y varios kits comerciales están disponibles. Se ha dicho que la sensibilidad del ELISA es "comparable y posiblemente mayor que el cultivo en condiciones óptimas" (Jansson *et al*, 1996). Lamentablemente ELISA no funciona muy bien en fluido ovárico o líquido seminal (Pascho *et al*, 1998) además que las diversas evaluaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad no se han llevado a cabo de manera uniforme, por lo que es insuficiente la información en este ámbito (Baudin *et al*, 1999).

2.5.9.2.3. Pruebas moleculares

A) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa ha sido utilizado recientemente para la detección e identificación de *R. salmoninarum* directamente en el fluido ovárico o huevos individuales. Brown *et al*. (1994) describe un método de PCR para la detección de *R. salmoninarum* en huevos de salmón coho o plateado (*Oncorhynchus kisutch*) y chinook o real (*O. tshawytscha*). La región del ADN amplificado, producto de 501 pares de bases, pertenece al gen que codifica para la proteína antigénica p57. La reacción puede llevarse a cabo de sólo 100 microlitros de tejido sospechoso homogeneizado y permite la detección de tan sólo 2 células bacterianas por huevo con un alto grado de especificidad (Brown *et al*, 1995).

Se utilizó el PCR para detectar *R. salmoninarum* en muestras de fluido de ovario en comparación con el cultivo y ELISA de riñón. El método de PCR para fluido ovárico no

detectó significativamente más positivos que las otras técnicas, pero fue más rápido (1-2 días) y no era letal, el fluido ovárico se obtiene del desove. La sensibilidad de la técnica fue de 1 a 10 bacterias por ml (Magnusson *et al*, 1994).

Luego Chase y Pascho (1998) desarrollaron un PCR anidado para detectar un segmento de ADN de 320 pb del gen que codifica la proteína p57. La sensibilidad del método se incrementó a cien, en comparación con un método de PCR convencional. La especificidad del PCR anidado se confirmó evaluando extractos de ADN de bacterias patógenas comunes de peces y un grupo de especies bacterianas que reportaban causar reacciones falso-positivos en el ELISA y la IF. Se revisaron muestras de riñón de salmón chinook infectados por métodos de PCR anidado, ELISA e IF, detectándose prevalencias de *R. salmoninarum* de 61%, 47% y 43% respectivamente.

Una comparación de métodos de detección de *R. salmoninarum* en el fluido ovárico, sugiere que la prevalencia de *R. salmoninarum* en ovas acopladas en pares de poblaciones donde BKD es enzoótico puede ser mucho mayor de lo previsto (Brown *et al*, 1994; Pascho *et al*, 1998; Baudin *et al*, 1999). Se ha advertido sin embargo, que muestras positivas a PCR pueden contener cierta proporción de *R. salmoninarum* muertos con niveles detectables de ADN (Miriam *et al*, 1997).

El PCR es útil para el análisis de fluido ovárico, pero no para el líquido seminal debido al alto contenido de ADN del líquido seminal que es un problema en el PCR (Baudin *et al*, 1999).

B) Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (PCR real time)

En la actualidad, ya existe un ensayo de PCR anidado para la detección del gen de la proteína p57, pero la cuantificación exacta del PCR anidado es extremadamente difícil y esto se ve agravado por el aumento del nivel de falsos positivos observados con esta técnica. Además, la cuantificación de material nucleico es más exacta porque el producto de amplificación se cuantifica en cada ciclo de amplificación (Powell *et al*, 2005). Esta técnica además, tiene la posibilidad de cuantificar el nivel de infección en contraste con el PCR convencional (Jansson *et al*, 2008).

En el PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Costa, 2004).

Inicialmente, el PCR a tiempo real se desarrolló para la detección de los genes *msa* que codifican la proteína p57 del *Renibacterium salmoninarum* (Powell *et al*, 2005; Chase, *et al*, 2006; Bruno *et al*, 2007), sin embargo en la actualidad estudios con RT PCR a tiempo real se están llevando a cabo (Halaihel *et al*, 2009).

Se ha confirmado el valor del PCR a tiempo real como prueba diagnóstica para detectar *Renibacterium salmoninarum* en fluido ovárico, mostrando ser 10 veces más sensible que el ELISA, sin embargo no ha sido probado en infecciones naturales (Jansson *et al*, 2008). Así mismo, esta técnica ha tenido éxito con una gran variedad de muestras como tejido renal, fluido ovárico, sangre y ovas, sumado a su alta especificidad y sensibilidad con su capacidad cuantitativa, es extremadamente valiosa como una herramienta diagnóstica en el manejo del BKD (Powell *et al*, 2005).

La utilización del PCR a tiempo real para el *Renibacterium salmoninarum*, tiene aplicaciones que van más allá de la detección y cuantificación del genoma de la bacteria, también permite la detección y cuantificación de secuencias de ARNm para organismos viables de *R. salmoninarum*; correlacionando los niveles de secuencia genómica del agente con la secuencia activamente transcrita se puede proveer un estimado de la presencia del patógeno y su estado de infección. Pudiendo aplicarse en la necesidad de aplicar la terapia profiláctica con eritromicina en poblaciones jóvenes en ausencia de mortalidad (Powell *et al*, 2005).

Dependiendo del propósito y la información necesaria, una u otra prueba pueden utilizarse, así por ejemplo, si se desea un estudio de prevalencia el ELISA es una herramienta útil, pero si se desea un mayor grado de precisión como al declarar poblaciones libres de *R. salmoninarum*, técnicas moleculares como el PCR y RT PCR a tiempo real pueden utilizarse, dado que resultan más costosas (Halaihel *et al*, 2009).

2.5.10. Prevención y control

2.5.10.1. Prevención

Respecto de las estrategias para evitar la transmisión horizontal, como una acción previa a la instalación de la piscicultura, idealmente se debería conseguir una fuente de agua, ya sea de vertiente o de un afluente donde no existan poblaciones silvestres de especies salmónidas. En este mismo sentido, se debería tratar de evitar el empleo de aguas cuando existen otras pisciculturas cercanas, en especial las de curso arriba de los afluentes del posible lugar de cultivo. Por otra parte, es importante considerar las medidas sanitarias de desinfección y otras para evitar la diseminación de la bacteria dentro de una piscicultura. Además es muy recomendable tener especímenes de una sola generación y efectuar períodos de descanso y desinfección de las instalaciones (Smith P, 2001).

Se ha logrado inactivar la bacteria con uso de cloro, donde lo importante es el tiempo de exposición (Pascho *et al*, 1995; Pascho y Ongerth, 2000), se recomienda en desinfección de estanques, vías de flujo y materiales de trabajo a 40 mg/L por 30 minutos o para pediluvios y rodoluvios con 100 mg/L (Enríquez *et al*, 2000).

A pesar de los avances que han existido en la vacunación, no existe aún una vacuna con una documentación consistente de su valor inmunoprotectivo como para recomendar su uso como medida inmunoprofiláctica habitual. Sobre esta materia, existe abundante información en la literatura (Smith P, 2001).

2.5.10.2. Control

El control de la renibacteriosis con métodos convencionales de tratamiento sigue siendo problemático debido a la naturaleza de la infección intracelular del *R. salmoninarum*, de modo que actualmente no existe un tratamiento práctico de la enfermedad (Baudin *et al*, 1999). Se evaluaron a más de 70 compuestos antimicrobianos tanto *in vivo* como *in vitro*, encontrándose que antibióticos como la clindamicina, eritromicina, kitasamicina, penicilina G y la espiramicina fueron útiles para la lucha contra casos clínicos tempranos de renibacteriosis y que cefradina, lincomicina y rifampicina fueron efectivas profilácticamente (Austin; 1985). Otra

alternativa terapéutica en truchas arcoíris es la utilización de enrofloxacin a una dosis de 1.25-2.5 mg/Kg durante 10 días (Hsu *et al*, 1994).

En otros lugares, ha habido informes de que la inyección de fosfato de eritromicina en hembras reproductoras antes del desove reduce significativamente la transmisión vertical de la renibacteriosis (Sakai *et al*, 1986, Evelyn *et al*, 1986b, Lee y Gordon, 1987, Lee y Evelyn, 1994). De hecho los niveles terapéuticos de este antibiótico se han detectado en la yema de los huevos y el saco vitelino de los alevines durante el periodo de incubación o hatchery (Brown *et al*, 1990). Dosificaciones en los reproductores no elimina la infección de *R. salmoninarum* en los tejidos y los huevos, pero combinado con buenas técnicas de crianza es posible reducir significativamente la incidencia de la renibacteriosis en los criaderos por este medio de transmisión (Lee y Evelyn, 1994).

Por otro lado se puede reducir la mortalidad que ocasiona un brote de BKD empleando algunos antibióticos como la eritromicina en el alimento para juveniles 100-200 mg/Kg por 21 días evitando perjudicar la palatabilidad (Moffitt, 1991), y desinfectando las ovas con solución yodada (100ppm) durante 15 minutos (Fryer, 1989).

Debido a la presencia de la bacteria en peces silvestres, su capacidad para persistir en niveles bajos en las poblaciones de peces de crianza y la ausencia en muchos casos, de los signos clínicos evidentes en las poblaciones infectadas, hacen al BKD muy difícil, incluso imposible de erradicar completamente por métodos tradicionales (sacrificio sanitario) de las zonas geográficas donde es endémico (Baudin *et al*, 1999). En las piscigranjas individuales, sin embargo, cuando el suministro de agua proviene de una fuente libre de peces, puede ser posible para erradicar la enfermedad por el sacrificio sanitario. En estos casos, el suministro de agua debe ser de un pozo o de un manantial donde no hay posibilidad de peces que vivan aguas arriba. Además debe haber una barrera para impedir cualquier migración de los peces silvestres en la explotación o su suministro de agua (Baudin *et al*, 1999).

Después de un intento de erradicación por sacrificio sanitario, la granja debe ser repoblada con material certificado libre de BKD, estos deben ser estrechamente monitorizados para determinar si el programa de erradicación ha sido exitoso. Esta vigilancia debe incluir inspecciones regulares y exámenes de laboratorio, por ejemplo, 2 inspecciones y exámenes por año, se sugiere que este control se mantenga durante un período de al menos dos años antes de que la granja sea oficialmente reconocida como

"libre". Después de la repoblación, se deben tomar medidas para reducir la posibilidad de la reinfección por la transmisión mecánica del agente de la enfermedad, estas medidas deberían incluir las restricciones al acceso de los visitantes, el sitio y la limpieza de vehículos y las medidas de control de aves, tales como cercas con alambres o redes para evitar que las aves tengan acceso a la granja (Baudin *et al*, 1999).

La restricción de las importaciones de ovas sin certificaciones de sanidad reducirá aún más los riesgos. Así mismo los programas de selección sanitaria debe llevarse a cabo durante un período prolongado de tiempo (2 años como mínimo) por las autoridades competentes utilizando técnicas reconocidas como ELISA, PCR y métodos bacteriológicos estándar (OIE, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El procesamiento de las muestras y el diseño experimental se realizó en la ciudad de Lima, en el laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Sección de Ictioptología, así como el laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria sección Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

El muestreo del presente estudio se realizó en una piscigranja ubicada en la región de Junín en los meses de Agosto (temporada seca), Setiembre, Noviembre (temporada de inicio de lluvias) y Febrero (temporada de lluvias). Se eligió esta piscigranja porque en anteriores trabajos se encontraron truchas arcoíris positivas a *Renibacterium salmoninarum* mediante lesiones macroscópicas, microscópicas confirmadas mediante Inmuno Fluorescencia Indirecta (Talavera, 2008) y PCR Tiempo Real (Arauco, 2010). Dicha piscigranja se encuentra ubicada en la microcuenca del río Achamayo, el cual es un afluente del río Mantaro.

El centro de producción visitado denominado “Piscigranja”, fue durante el ciclo de lluvias del 2011-2012. El centro está ubicado en la provincia de Huancayo a una altitud aproximada de 3540 msnm. Según datos de la piscigranja, la temperatura promedio del agua de cultivo es de 10.8°C, Oxígeno disuelto de 7.5 mg/L y un pH de 7.3. La fuente hídrica es el río Chiapuquio que en invierno tiene un caudal mínimo de 750 L/seg y máximo de 2500 L/seg. El ciclo de producción intensiva es completo, contando con sala de incubación, estanques de alevinaje, juveniles, pre-comerciales (engorde) y comerciales (acabado). Sus instalaciones son estanques de concreto construidos con el sistema americano. La producción total de trucha asciende entre 150-200 TM por año, siendo el principal mercado local.

3.2. Información meteorológica

La información sobre los eventos de precipitación fue obtenida a partir del banco de datos históricos de la estación meteorológica “Ingenio”, perteneciente al Servicio Nacional de Hidrología y Meteorología e Hidrología del Perú (SENHAMI) ubicada a 3422 msnm en el distrito Santa Rosa de Ocopa de la provincia Concepción del departamento de Junín. Los datos de precipitación son obtenidos por evaluaciones diarias durante todo el año y son expresados en milímetros (mm) de agua pluvial acumulada.

3.3 Evaluación Físico-Química del agua

Se tomaron muestras de agua del estanque donde se encuentra la población de truchas evaluadas el día en que se realizaron los muestreos.

Para la “Piscigranja” el análisis del agua se realizó el mismo día mediante el Kit de análisis comercial Físico-químico de agua de cultivo; SERA Aqua-test Box, donde se evaluaron los parámetros de pH, amoníaco, oxígeno disuelto, dureza de carbonatos y fosfatos. La toma de muestra se realizó manualmente mediante el llenado de un frasco especial para evaluación de agua, proporcionado por el kit, a un metro de profundidad respecto a la superficie del agua (espejo de agua) del estanque de cultivo, los procedimientos posteriores fueron según las especificaciones del Kit. Se evaluó también la temperatura mediante el uso de un termómetro ambiental de máxima de mercurio cuyo rango de sensibilidad es de -10 °C a +50°C. Así mismo, la evaluación de la transparencia del agua fue mediante inspección visual de las pozas y el uso del disco de Secchi el cual fue sumergido hasta el fondo de la poza de donde se obtuvieron los peces del presente estudio. Los valores fueron determinados subjetivamente mediante la siguiente clasificación:

- Transparencia Alta: Se observa fácilmente los contrastes del disco de Secchi
- Transparencia Intermedia: Se observa con cierta dificultad los contrastes del disco de Secchi
- Transparencia Baja: No se observa los contrastes del disco de Secchi.

3.4. Animales y muestras

3.4.1. Tamaño de muestra

Para el número de muestra, nos basamos en lo publicado por el *Manual de Animales Acuáticos* de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, 2012) el cual determina el tamaño de muestra aleatoria para la vigilancia epidemiológica de especies acuáticas considerando el porcentaje de prevalencia de la enfermedad estudiada y los niveles de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica a utilizar (cuadro N°8).

Cuadro 8. Tamaño de muestra aleatoria en función de la supuesta prevalencia del patógeno en el lote, adjudicando a la técnica un 100% de sensibilidad y especificidad (OIE, 2012) donde N: número de peces a muestrear.

Tamaño de la muestra a prevalencia del 2%	Tamaño de la muestra a prevalencia del 5%	Tamaño de la muestra a prevalencia del 10%
N: 149	N: 59	N: 29

Fuente: OIE, 2012

En el presente estudio establecimos que la prevalencia de *R. salmoninarum* en trucha arcoíris es del 5 % basándonos en los hallazgos de Talavera (2008) quien determino una frecuencia de 15,2% mediante Inmunofluorecencia Indirecta en trucha arco iris y Arauco (2010) quien señalo una frecuencia de 5.7% mediante PCR tiempo real, también en trucha arco iris. Así mismo, adjudicamos a nuestra prueba PCR tiempo real una sensibilidad y especificad de 100% para ambos, respectivamente; en base a los resultados de Arauco (2010). De esta forma obtenemos un tamaño de muestra (n) de 59 peces.

Los peces fueron colectados en relación al patrón de desenvolvimiento del periodo de lluvias que se manifestaron en el valle del Mantaro. Las precipitaciones en la cuenca del río Mantaro tienen un ciclo anual caracterizado por una temporada lluviosa bien marcada durante los meses de enero-marzo, una temporada seca marcada entre mayo y agosto y un inicio de la temporada de lluvias gradual, lenta y variable, que ocurre entre los meses de setiembre y diciembre. Por ello puede dividirse el ciclo lluvioso en tres partes: La temporada seca de mediados de abril a

agosto; la temporada de inicio de las lluvias de setiembre a diciembre y la temporada de lluvias de enero a marzo (IGP, 2005).

De acuerdo a esto desarrollamos el siguiente esquema de trabajo detallado en el cuadro N°9. Por fines prácticos consideramos un tamaño de muestra de 60 peces por mes, obtuvimos 240 peces que fueron analizados.

Cuadro 9. Esquema de toma de muestra para la piscigranja de acuerdo al patrón de desarrollo de las precipitaciones pluviales en la cuenca del valle del Mantaro descritas por el IGP (2005).

Temporada Pluvial	Número de peces colectados	
Temporada seca o sin precipitaciones	Agosto	60
(*)Temporada de inicio de lluvias	Setiembre	60
	Noviembre	60
Temporada de lluvias	Febrero	60

Fuente: Elaboración propia

(*)Se realizó dos muestreos de la temporada de inicio de lluvias debido a que esta se manifiesta de manera gradual lenta y variable. (IGP, 2005 b) a diferencia de las otras dos temporadas cuyos valores de precipitación son semejantes durante toda la temporada.

3.4.2. Características de la muestra

Las muestras constaron de tejidos de riñón y bazo provenientes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles mayores a 6 meses de edad. Los peces fueron tomados al

azar mediante una red, no distinguiendo clínicamente de individuos enfermos de individuos sanos.

3.4.3. Cepas de referencia

Se utilizó el ácido desoxirribonucleico proveniente de cepas *Renibacterium salmoninarum* del laboratorio del SVA (The National Veterinary Institute - Suecia) como control positivo para la prueba de PCR.

3.5. Metodología

3.5.1. Obtención de muestras

La toma de muestra fue realizada en un día completo de labor. Se inició a las 9:00 am y se culminó a las 5:00 pm del mismo día. Esto se repitió cuatro veces puesto que son cuatro meses distintos para la toma de muestra en cada piscigranja.

Los peces fueron tomados al azar de distintas pozas mediante carcales (red en forma de canastilla sujeto a una asa de madera de 1.5 m), todos pertenecientes a un mismo lote (entiéndase por lote al grupo de animales de una misma edad y condiciones de manejo). Los peces fueron mantenidos en baldes con agua de las pozas hasta su traslado al área donde se encontraba instalado y preparado los materiales de trabajo para la identificación, necropsia y obtención de muestra de los peces.

3.5.1.1 Necropsias:

La inspección, colección y conservación de las muestras se realizaron el mismo día. Se realizó la necropsia de los peces colectados según recomendaciones de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, 2007) y Noga (2010). Se utilizó Eugenol vía baño de inmersión por 3-5 minutos a dosis de 60mg de Eugenol disuelto en un (1) litro de agua para reproducirlos planos 1 y 2 de la Etapa II de anestesia de los peces el cual se confirmó mediante observación de los signos de pérdida parcial o total del equilibrio, reducción de la ventilación y pérdida del tono muscular. A continuación se procedió a realizar el corte medular con bisturí, entre el cerebro y la médula espinal, y por último se realizó el corte de las branquias para producir desangrado y en consecuencia, la muerte del pez.

Se identificó y anotó la talla de cada pez, luego se efectuó un cuidadoso examen de la superficie corporal anotándose la presencia de anormalidades visibles macroscópicamente. Se evaluó la homogeneidad de la piel, erosiones y posible presencia de exoftalmia, luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol de 70° mediante el uso de una torunda.

El proceso de necropsia se llevó a cabo mediante la metodología recomendada por Noga (2010), dejando expuestas *in situ* las vísceras. Una vez expuestas las branquias y la cavidad celómica, se procedió a efectuar un examen macroscópico de órganos internos para determinar y anotar alguna anormalidad o lesión.

3.5.1.2 Obtención de muestra para PCR tiempo real:

Con tijera y pinza estéril se obtuvo aproximadamente 5 gramos de riñón de cada pez mediante cortes transversales de 0.5-1 cm aproximadamente del tejido renal craneal, así mismo se extrajo aproximadamente 5 gramos de bazo, realizando un corte central del órgano. Ambos órganos fueron colocados en una misma bolsa plástica por pez. Cada una de ellas fue rotulada y conservadas en congelación (-196°C) dentro de un tanque de nitrógeno líquido hasta su posterior procesamiento.

3.5.2 Procesamiento de las muestras

3.5.2.1. Obtención de ADN

3.5.2.1.1 Preparación de las moliendas de tejido

Se preparó las moliendas, mediante pilón y mortero estériles, de las muestras obteniéndose un pool de bazo y riñón por cada animal identificado; alicuotándose en 500 µl (microlitros) de suero fisiológico estéril. Cada molienda fue almacenada y rotulada en crioviales los cuales fueron conservadas en congelación (-70 °C) hasta el momento de la extracción.

3.5.2.1.2 Extracción de ADN:

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN de bacterias Gram-positivas, por pertenecer *Renibacterium salmoninarum* a este grupo de bacterias. El proceso de extracción se realizó de hasta 10 muestras a la vez como máximo, para evitar contaminación entre ellas.

Las muestras fueron sometidas a centrifugación formándose un pellet que fue resuspendido en una solución amortiguadora (búffer) de digestión que contiene lisozima y proteinasa K. Este proceso sirve para lisar el tejido, pared celular y desnaturalizar proteínas. Seguidamente se agregó solución de fenol para precipitar proteínas como nucleasas, así como solución de cloroformo; para precipitar lípidos restantes aun mismo volumen de la muestra original respectivamente, luego de pasar por centrifugación se recuperó el sobrenadante el cual contiene ADN en disolución. El ADN fue deshidratado y precipitado mediante la adición de Etanol absoluto en el lapso de 12 horas continuas. Luego se recuperó el ADN peletizado y fue resuspendido en agua libre de nucleasas, posteriormente fue almacenado a -70°C hasta el momento de la lectura por PCR tiempo real (Anexo N° 1).

3.5.2.2. PCR tiempo Real:

Se utilizó el protocolo de PCR tiempo real para enfermedad bacteriana en trucha arco iris, anteriormente validado y publicado por Arauco (2010) (Anexo N°2), donde los cebadores (primers) utilizados fueron diseñados bajo la secuencia de datos del Genbank de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) para la proteína P57 del *Renibacterium salmoninarum* cepa ATCC 33209. La interpretación de los resultados se basó en que una muestra será positiva a BKD cuando se detecte un producto ADN amplificado con una temperatura de disociación (Tm) específica, que en este caso se trata de 84.2 C° y ciclo umbral (CT) dependiente de la concentración de ADN bacteriano (Cuadro N° 10).

Cuadro 10: PCR tiempo real. Temperatura de disociación (T_m) y ciclo umbral (C_T) de los productos obtenidos para el set de cebadores diseñados para la proteína P57.

	C(T)	T_m	Estado
BKD 0.01 ng	31	84.2	+
BKD 0.1 ng	28	84.2	+
BKD 1 ng	25	84.2	+
BKD 10 ng	21	84.2	+

Fuente: Arauco, 2010

3.5.3. Análisis estadístico de los resultados

Para el presente estudio de haber obtenido prevalencias de *Renibacterium salmoninarum* en los peces muestreados, se planteó utilizar la prueba estadística de Chi Cuadrado para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las prevalencias obtenidas de cada etapa del periodo de lluvia.

4. RESULTADOS

4.1 Condiciones Pluviales

Según el banco de datos históricos de la estación “Ingenio” del SENAMHI se tiene a continuación los datos de las precipitaciones, ocurridas para los meses de cada ciclo de lluvias en que se realizó la toma de muestra del presente estudio, ilustrados en el N° 11 para las “Piscigranjas”. El ciclo de lluvias presento un desenvolvimiento acorde a lo señalado por el IGP con un periodo de seca (mínimas o sin precipitaciones) en agosto, seguido por la variable y gradual temporada de inicio de lluvias entre los meses de setiembre y diciembre, tornándose luego con precipitaciones moderadas entre los meses de diciembre a marzo que conforman la temporada de lluvias.

Para el ciclo de lluvias 2011-2012, el mes de agosto que pertenece a la temporada de seca no mostró señales de precipitación alguna. Así mismo, los meses de Setiembre y Noviembre pertenecientes a la temporada de inicio de lluvias mostraron precipitaciones cuyos valores de acumulado de precipitaciones fueron de 49.4 mm y 54.9 mm respectivamente. Por otro lado, el mes de febrero (el cual no presenta ningún registro por parte del SENAMHI por motivos desconocidos) perteneciente a la temporada de lluvias se le adjudico un valor de acumulado de precipitaciones de 81.9 mm (obtenido a partir de la media geométrica del trimestre Enero-Febrero-Marzo 2012 o temporada de lluvias) (Cuadro N°11).

Cuadro 11: Resumen de los datos del ciclo de lluvias del periodo 2011-2012 registrados por la estación Ingenio del SENAMHI.

	Mes	Días registrados con precipitaciones	Acumulado de precipitaciones en mm
Temporada seca	Mayo 2011	4 días	12.8 mm
	Junio 2011	0 días	0 mm
	Julio 2011	1 días	4.1 mm
	(*)Agosto 2011	0 días	0 mm
Temporada Inicio de precipitaciones	(*)Setiembre 2011	09 días	49.4 mm
	Octubre 2011	10 días	74.2 mm
	(*)Noviembre 2011	11 días	54.9 mm
	Diciembre 2011	18 días	135.3 mm
Temporada de precipitaciones	Enero 2012	13 días	88.6 mm
	(*)Febrero 2012	(**)15 días	(**)81.9 mm
	Marzo 2012	16 días	75.7 mm
	Abril 2012	17 días	123.8 mm

(*) Meses en que se realizó la toma de muestra.

(**) Por ausencia de información por parte del SENAMHI, los datos fueron obtenidos a partir de la media geométrica de los datos de los meses enero y marzo del año 2012 de la estación meteorológica “Ingenio”.

Fuente: Elaboración propia a partir del Banco de datos Históricos del SENAMHI

Al comparar la media de precipitación acumulada mensual (mm/mes) de la estación Ingenio obtenida por IGP (2005) durante el estudio de los ciclos de lluvias durante el periodo 1960-2002, con lo obtenido para el ciclos de lluvias 2011-2012, observamos que el acumulado mensual para los meses de agosto (0 mm), Noviembre (54.9 mm) y febrero (81.9 mm) se ubican por debajo de la media acumula mensual registrada para esos meses, mientras que el

acumulado mensual del mes de setiembre (49.4 mm) fue mayor al de la media acumulada mensual (29.2 mm) (Cuadro N°12)

Cuadro 12: Climatología del acumulado mensual (mm/mes) de precipitación en la estación “Ingenio”

	Mes	Ciclo de lluvias 2011- 2012	Ciclos de lluvias Periodo 1960-2002 (IGP, 2005)
Temporada seca	Agosto	0 mm	9.0 mm
Temporada	Setiembre	49.4 mm	29.2 mm
Inicio de	Noviembre	54.9 mm	81.0 mm
precipitaciones			
Temporada			
Precipitaciones	Febrero	81.9 mm	131.4 mm
significativas			

Fuente: Elaboración propia a partir del Banco de datos Históricos del SENAMHI

4.2 Caracterización de las propiedades físico-químicas del agua.

Se tiene a continuación los resultados de la evaluación de los parámetros físicos-químicos del agua de los estanques de cultivo de donde se obtuvieron los peces para el presente estudio en las piscigranja en el cuadro N°13.

Se observó un aumento gradual de la concentración de fosfatos disueltos en agua cuyo valor mínimo corresponden a la temporada seca durante el mes de agosto (0.1mg/L) y el máximo a la temporada de lluvias durante el mes de febrero (0.5mg/L). De forma semejante se registró el grado de concentración de Nitrógeno amoniacal que fue de 0mg/L en el mes de agosto, para luego tornarse a un valor constante de 0.5 mg/L para los meses de setiembre, noviembre y Febrero. Sin embargo el parámetro de dureza de carbonatos se desenvolvió de manera inversa, donde su valor máximo (179mg/L) corresponde al mes de Agosto (temporada seca) y su valor

mínimo (143.2mg/L) a los meses de Setiembre (Temporada de inicio de Lluvias) y Febrero (temporada de lluvias), el mes de Noviembre presento un valor intermedio de 161.1 mg/L. Por otro lado el valor del oxígeno disuelto fue de 6mg/L para el mes de Agosto, luego descendió a un valor constante de 4mg/L para los meses de Setiembre, Noviembre y Febrero. La transparencia del agua fue alta para los meses de Agosto y Setiembre, luego fue intermedia para los meses de Noviembre y Febrero. El pH se mostró constante durante los cuatro meses evaluados a un valor de 8.5. La temperatura de agua se registró con un valor mínimo de 11°C en el mes de agosto y febrero respectivamente, y un valor máximo de 11.3°C en el mes de setiembre, el mes de noviembre registro 11.1°C (Cuadro N°13).

Cuadro 13: Resultados físico-químicos del agua de las pozas de cultivo durante el Ciclo de Lluvias 2011-2012.

Mes	Fosfatos 1mg/L	Nitrógeno Amoniacal mg/L	(Carbonatos) Dureza mg/L	Oxígeno Disuelto g/L	Transparencia	pH	Temperatura (°C)
Agosto	0.1	0	179	6	Alta	8.5	11
Setiembre	0.25	0.5	143.2	4	Alta	8.5	11.3
Noviembre	0.1	0.5	161.1	4	Intermedia	8.5	11.1
Febrero	0.5	0.5	143.2	4	Intermedia	8.5	11

Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

4.3. Hallazgos de la necropsia

Al examen de necropsia se evidenciaron lesiones externas como internas en las truchas observándose que en la temporada de inicio de lluvias y la temporada de lluvias se observó el mayor número de lesiones respecto a la temporada seca (Cuadro 14 y 15).

4.3.1 Lesiones Externas

Se pudo observar que del total de lesiones externas las de más alta frecuencia de presentación para todas las temporadas fueron melanosis y podredumbre de aleta caudal. Mientras que la opacidad ocular, exoftalmia, hipema y úlceras en piel registraron bajas y variables frecuencias de presentación y la escoliosis y distensión abdominal, aún más bajas en cada una de las temporadas. (Cuadro N° 14).

La melanosis (Figura N°2), fue la lesión con mayor frecuencia en la “Piscigranja” en las tres temporadas del ciclo de lluvias. Presento un aumento gradual en su frecuencia de presentación durante la temporada de inicio de lluvias (26.6% y 31.6) y la temporada de lluvias (46.6%), respecto a la temporada seca (20%) (Cuadro N°14).

Figura 2: Normal (A), Melanosis (B)



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

Las lesiones oculares como exoftalmia, hipema y opacidad ocular así como la podredumbre de aleta caudal y úlceras en la piel (Figura N°3) fueron más frecuentes en la temporada de lluvias para la “Piscigranja”. (Cuadro N°14).

La opacidad ocular mostro un incremento en su frecuencia de presentación en el mes de setiembre (inicio de temporada de lluvias) respecto al mes de agosto (temporada seca) para luego disminuir en los meses de noviembre y febrero. La exoftalmia mostro una frecuencia baja (3.3%) durante la temporada seca en el mes de agosto, luego se incrementó durante la temporada de inicio de lluvias en el mes de setiembre (10%) y lluvias en el mes de febrero (13%). El hipema mantuvo una frecuencia de presentación de 5% en los meses de agosto y setiembre, luego disminuyo su presentación (1.6%) en noviembre, y finalmente se incrementó (8.3%) en el mes de febrero para la “Piscigranja”. (Cuadro N°14).

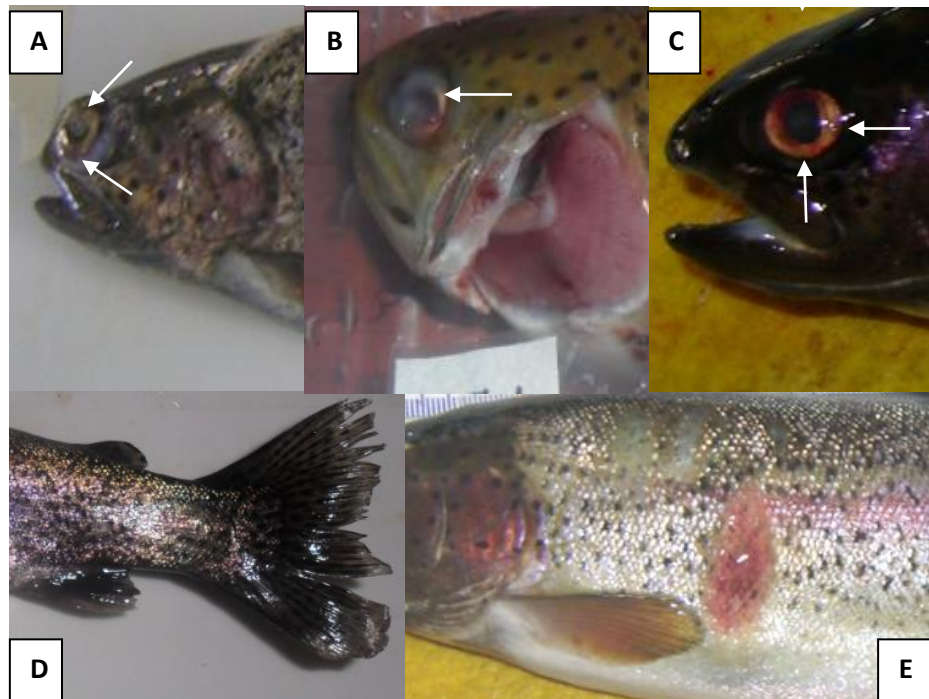
Cuadro 14: Lesiones externas halladas en truchas arcoíris.

Lesiones externas	Temporada									
	Seca		Inicio de Lluvias				Lluvias		Total	
	Agosto		Setiembre		Noviembre		Febrero			
Melanosis	12/60	20%	16/60	26.6%	19/60	31.6%	28/60	46.6%	75/240	31.25%
Palidez Branquial	19/60	31.6%	17/60	28.3%	0/60	0%	0/60	0%	72/240	30%
Podredumbre aleta caudal	8/60	13.3%	15/60	25%	14/60	23.3%	23/60	38.3%	60/240	25%
Opacidad ocular	2/60	3.3%	16/60	26.6%	5/60	8.3%	3/60	5%	26/240	10.8%
Exoftalmia	2/60	3.3%	0/60	0%	6/60	10%	8/60	13.3%	16/240	6.6%
Hipema	3/60	5%	3/60	5%	1/60	1.6%	5/60	8.3%	12/240	5%
Ulceras en piel	2/60	3.3%	0/60	0%	4/60	6.6%	5/60	8.3%	11/240	4.5%
Escoliosis	5/60	8.3%	4/60	6.6%	0/60	0%	0/60	0%	9/240	3.7
Distensión abdominal	2/60	3.3%	3/60	5%	1/60	1.6%	0/60	0%	6/240	2.5%

Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

Las úlceras en la piel en la “Piscigranja” presentaron un incremento en su frecuencia de presentación durante el mes de noviembre en la temporada de inicio de lluvias (6.6%) y la temporada de lluvias (8.3%) (Cuadro 14). De la misma manera, la podredumbre de aleta caudal, aumento gradualmente en su frecuencia de presentación durante los meses de setiembre y noviembre en la temporada de inicio de lluvias (25% y 23.3%, respectivamente) y la temporada de lluvias (38.3%), además fue la segunda lesión con mayor frecuencia registrada en todas las temporadas (Cuadro N°14).

Figura 3: Exoftalmia(A), Opacidad ocular (B), Hipema (C), Podredumbre de aleta caudal (D), Úlcera lateral en piel (E).

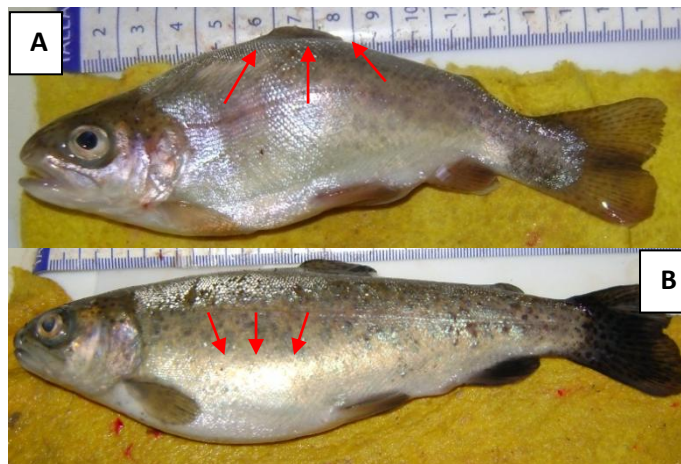


Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

La escoliosis así como la distensión abdominal (Figura N°4 A y B, respectivamente) en la “Piscigranja B” fueron las de más baja frecuencia de presentación en todas las temporadas (Cuadro N° 14). La escoliosis (Figura N°4 A) mostro un descenso en su presentación comenzando con una frecuencia alta en la temporada seca (8.3%), luego disminuyo a 6.6 % en el mes de setiembre (temporada de inicio de lluvias), finalmente se tornó ausente en los meses de noviembre y febrero (temporada de lluvias).(Cuadro N° 14). La distensión abdominal (Figura 4 B) mostro un incremento de su presentación en la temporada de inicio de lluvias en el mes de

setiembre (5%) respecto a la temporada seca (3.3%). En el mes de Noviembre disminuyo a 1.6%, finalmente no se observó dicha lesión en el mes de febrero, en la temporada de lluvias (Cuadro N° 14).

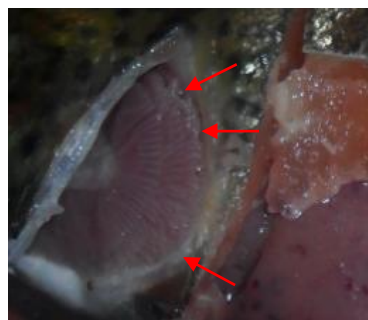
Figura 4: Escoliosis (A), Distención abdominal (B).



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

La palidez branquial (Figura N°5) presento un descenso en su frecuencia de presentación obteniéndose para la temporada seca la mayor frecuencia (31.6%) para luego disminuir (28.3%) durante el inicio de lluvias (agosto) y tornarse ausente (0%) durante los meses de noviembre y febrero en la “Piscigranja B” (Cuadro N°14).

Figura 5: Palidez branquial (flechas rojas)



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

4.3.2 Lesiones internas:

Por otro lado, en la en la “Piscigranja” la palidez hepática, esplenomegalia, congestión de ciegos pilóricos, congestión y dilatación del intestino posterior y la renomegalia fueron las lesiones con mayor frecuencia en todas las temporadas. Mientras que la atrofia y congestión del tejido graso peritoneal, la distensión estomacal y los granulomas en riñón fueron de moderada y variable frecuencia de presentación en cada una de las temporadas. Por otro lado, las hemorragias equimóticas en hígado, las hemorragias petequiales en tejido graso peritoneal, los granulomas en hígado y las hemorragias petequiales en los ciegos pilóricos fueron de menor presentación en cada una de las temporadas (Cuadro N°15)

La palidez hepática (Figura N° 6A) registro un incremento en su frecuencia de presentación en la “Piscigranja B” durante temporada de inicio de lluvias en el mes de setiembre(78.3%) respecto a la temporada seca (66.6%). Durante la temporada de lluvias descendió su frecuencia a 46%. Sin embargo fue la principal lesión presente en todas las temporadas. (Cuadro N°15).

La esplenomegalia (Figura 6A) mostro un descenso gradual de presentación en la “Piscigranja B” durante el ciclo de lluvias, siendo de presentación alta en la temporada seca (40%) para luego ir descendiendo en las temporadas de inicio de lluvias hasta llegar a su frecuencia más baja en la temporada de lluvias (21.6%).(Cuadro N°15).

La congestión de ciegos pilóricos mostro un comportamiento variable, siendo de moderada frecuencia (23.3%) en la temporada seca (agosto), luego se mantuvo incrementado en la temporada de inicio de lluvias (setiembre) y temporada de lluvias (febrero) con frecuencias de 50% y 40%, respectivamente en la “Piscigranja”. (Cuadro N°15).

La congestión y dilatación del intestino posterior registro un incremento de presentación en la temporada de lluvias respecto a las otras temporadas con una alta frecuencia de 51.6 % en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

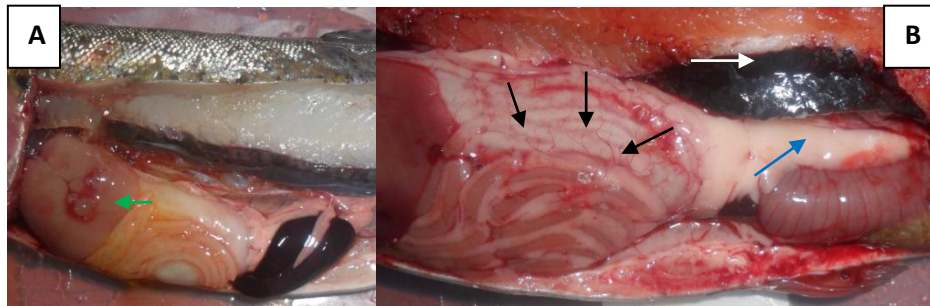
La renomegalia (Figura 6)presento un descenso gradual de su presentación. Mostrándose de alta frecuencia en los meses de agosto y setiembre, para luego tornarse de moderada frecuencia en el de noviembre y finalmente de baja frecuencia en el mes de febrero en la “Piscigranja”. (Cuadro N°15).

Cuadro 15: Lesiones internas halladas en trucha arcoíris.

Lesiones internas	Temporada								Total	
	Seca		Inicio de Lluvias				Lluvias			
	Agosto		Setiembre		Noviembre		Febrero			
Palidez hepática	40/60	66.6%	47/60	78.3%	18/60	30%	28/60	46%	133/240	55.4%
Esplenomegalia	24/60	40%	22/60	36.6%	19/60	31.6%	13/60	21.6%	78/240	32.5%
Congestión ciegos pilóricos	14/60	23.3%	30/60	50%	11/60	18.3%	24/60	40%	79/240	32.9%
Congestión/dilatación Intestino posterior	16/60	26.6%	5/60	8.3%	7/60	11.6%	31/60	51.6%	59/240	24.5%
Renomegalia pulposa	25/60	41.6%	25/60	41.6%	6/60	10%	2/60	3.3%	58/240	24.1%
Atrofia del Tejido graso peritoneal	25/60	41.6%	8/60	13.3%	6/60	10%	16/60	26.6%	55/240	22.9%
Congestión tejido graso peritoneal	3/60	5%	12/60	20%	7/60	11.6%	16/60	26.6%	28/240	15.8%
Distención estomacal	11/60	19.3%	10/60	16.6%	4/60	6.6%	6/60	10%	31/240	12.9%
Granulomas en riñón	4/60	6.6%	18/60	30%	4/60	6.6%	0/60	0%	26/240	10.8%
Hemorragia equimotica en hígado	6/60	10%	10/60	16.6%	2/60	3.3%	3/60	5%	21/240	8.7%
Hemorragia petequial en tejido graso peritoneal	2/60	3.3%	11/60	18.3%	0/60	0%	2/60	3.3%	15/240	6.25%
Granulomas en hígado	6/60	10%	9/60	15%	0/60	0%	0/60	0%	15/240	6.2%
Hemorragia petequial en Ciegos pilóricos	0/60	0%	7/60	11.6%	0/60	0%	0/60	0%	7/240	2.9%

Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

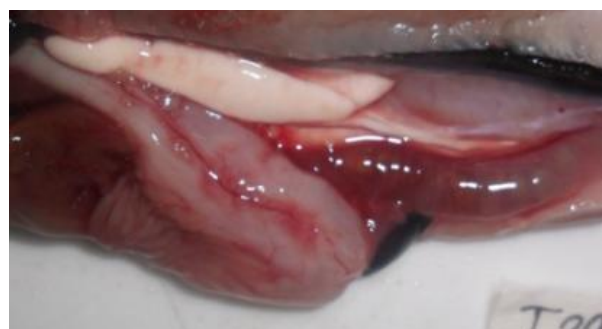
Figura 6: A: Palidez hepática (Flecha verde), Esplenomegalia (Flecha blanca), B: Congestión de ciegos pilóricos (Flechas negras), Congestión y dilatación del Intestino posterior (Flecha azul), Renomegalia (Flecha blanca).



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

La atrofia del tejido graso peritoneal (Figura N°7) fue de mayor de frecuencia en la temporada seca (41.6%), mientras que en la temporada lluvias fue de moderada presentación en el mes de Febrero (23.3%), por otro lado la temporada de inicio de lluvias en los meses de setiembre (13.3 %) y noviembre (10%) presento las menores frecuencias de presentación para esta lesión en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

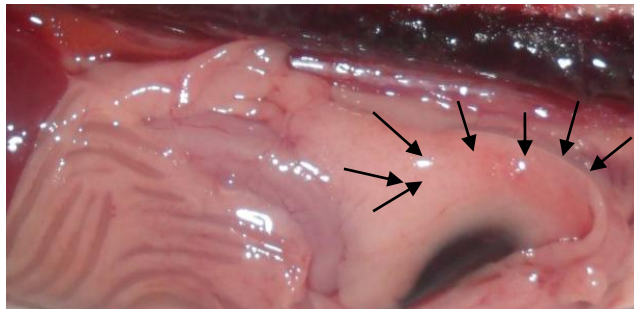
Figura 7: Atrofia del tejido graso peritoneal



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

La congestión de tejido graso peritoneal (Figura N°8) mostro un incremento de su presentación en la temporada de Inicio de lluvias en el mes de Setiembre (20%) y Noviembre (11.6%) y durante la temporada de lluvias en el mes de Febrero (26.6%), mientras que la temporada seca registró la menor frecuencia (5%) en la “Piscigranja”(Cuadro N°15).

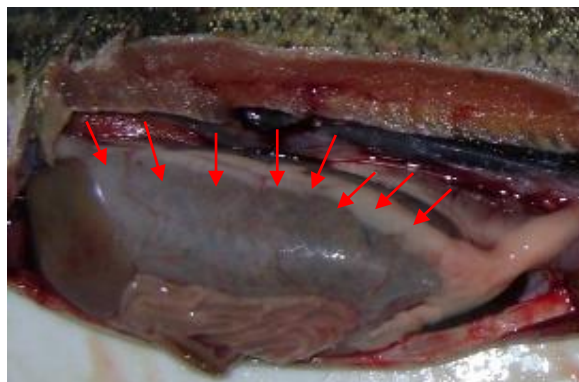
Figura 8: Congestión del tejido graso peritoneal



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

La distensión gástrica (Figura N°9) registro una alta frecuencia durante la temporada seca (19.3%), luego se registró un descenso durante la temporada de Inicio de lluvias en los meses de Setiembre (16.6%) y Noviembre (6.6%), finalmente se observó un moderado incremento durante la temporada de lluvias en el mes de Febrero (10%) en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

Figura 9: Distensión gástrica.



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

Los granulomas en riñón (Figura N°10) mostro una alta frecuencia en la temporada de Inicio de lluvias en el mes de Setiembre (30%), mientras que en los meses de Agosto y Noviembre se observa baja frecuencia (6.6%) y en la temporada de lluvias en el mes de Febrero no se registró ninguna presentación (0%) en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

Figura 10: Granulomas en riñón.

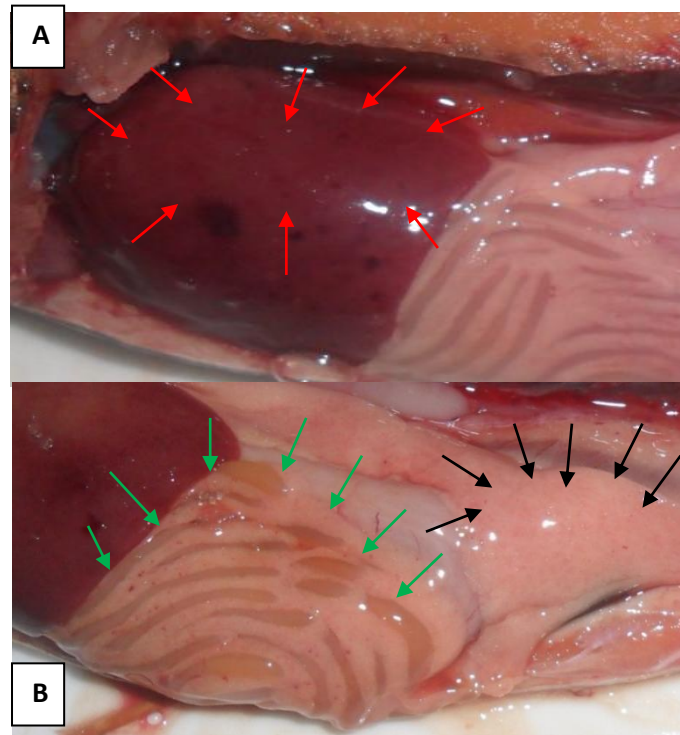


Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

Las hemorragias equimóticas en hígado (Figura 11A) mostraron su mayor frecuencia en la temporada de Inicio de lluvias en el mes de Setiembre (16.6%), mientras que en las temporadas seca en el mes de Agosto (10%) y en la temporada de lluvias en el mes de Febrero (5%) registro menores frecuencias en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

Las hemorragias petequiales en el tejido graso peritoneal (Figura 11B) fueron registradas con mayor frecuencia en la temporada de Inicio de lluvias en el mes de Setiembre (18.3%) mientras que las temporadas seca en el mes de Agosto (3.3%) y la temporada de lluvias en el mes de Febrero (3.3%) registraron bajas frecuencias en la piscigranja “El Ingenio”. (Cuadro N°18). Mientras que las hemorragias petequiales de los ciegos pilóricos (Figura 11B) solo registraron moderada frecuencia en la temporada seca en el mes de Agosto (10%) y en la temporada de Inicio de lluvias en el mes de Setiembre (15%), en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

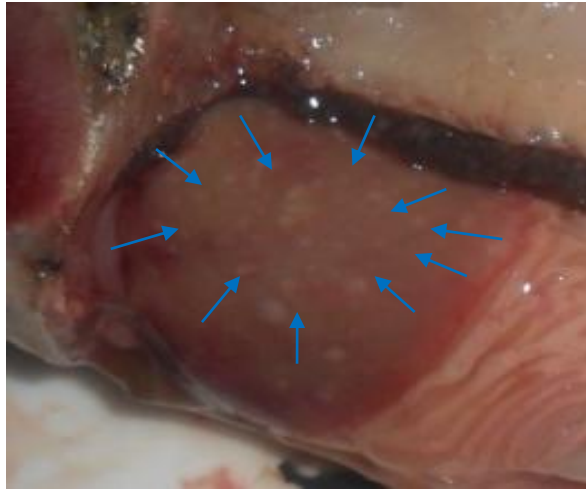
Figura 11: **A:** Hemorragia equimotica en hígado (Flechas rojas), **B:** Hemorragia petequial en ciegos pilóricos (Flechas verdes), Hemorragia petequial en tejido graso peritoneal (Flechas negras).



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

Los granulomas en el hígado mostraron una moderada frecuencia en la temporada de seca en el mes de Agosto (10%), luego se incrementó durante la temporada de Inicio de lluvias en el mes de setiembre (15%). En la temporada de lluvias en el mes de febrero no se registró esta lesión (0%) en la “Piscigranja” (Cuadro N°15).

Figura 12: Granulomas en Hígado



Fuente: Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Patología y Embriología de mamíferos-FMV UNMSM.

4.4. Diagnóstico por PCR a tiempo real

Se analizaron las muestras obtenidas de animales de campo de las dos piscigranjas (480 truchas). Estas muestras fueron sometidas a la prueba de PCR a tiempo real con el protocolo para cebadores (primers) diseñados, el cual fue validado por Arauco (2010). De la totalidad de muestras (n=480), la prueba de PCR a tiempo real no detectó genoma de *R. salmoninarum* en las muestras estudiadas (Anexo 3).

4.5 Asociación entre ciclo de lluvias y prevalencia de *R. salmoninarum*

No se encontró ninguna asociación entre los hallazgos de PCR tiempo real y las etapas de precipitación.

5. DISCUSION

Se ha previsto que el cambio climático tendrá efectos importantes sobre el parasitismo y las enfermedades en los ecosistemas de agua dulce y marinos, con consecuencias para la salud humana y aspectos socioeconómicos. Hasta la fecha, numerosos brotes de enfermedades, especialmente en los organismos marinos, se han asociado con eventos climáticos como El Niño-Oscilación del Sur (Marcogliese, 2008). Los estudios en peces de cultivo en agua dulce de nuestro país aún son limitados. Este trabajo es el primero en la aplicación de técnicas diagnóstico molecular para la determinación de la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en trucha arcoíris de cultivo asociado al fenómeno del cambio climático en el Perú.

IGP (2005) ha previsto, que las precipitaciones pluviales disminuirán en la zona central de la región de Junín por efecto del Cambio Climático, esto se corrobora al observar los acumulados de precipitación en el ciclo de lluvias del periodo 2011-2012 es inferior a la media de acumulado de precipitación determinado por IGP (2005) en su estudio retrospectivo de los ciclos de lluvias durante el periodo 1960-2002, a excepción de la temporada de lluvias en el mes de Febrero cuyo registro de acumulado de precipitación fue superior a este nivel medio, esto obedece a que puede existir una variación interanual en la intensidad de los ciclos de lluvias (IGP, 2005). Esta disminución global del volumen de las precipitaciones pudo haber disminuido el transporte del material geológico en el cauce de la microcuenca del río “Achamayo”. De esta forma el estrés medio ambiental producido por cuerpos sólidos en suspensión en el agua que “alimenta” las pozas de cultivo pudo ser menor respecto a otras épocas lluviosas.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la evaluación de la calidad Físico-Químico del agua de cultivo indicaron un aumento de la concentración de fosfatos superiores al valor referencial (0.1mg/L) que se indica para cultivo de peces, conforme las precipitaciones se hacen presentes. Su incremento está asociado con la eutrofización de las aguas, con problemas de crecimiento de algas indeseables en embalses y lagos, y con acumulación de sedimentos (Canepa de Vargas *et al*, 2004) esto puede incrementar el riesgo de estrés medio ambiental en los peces de cultivo al reducir la concentración de oxígeno disuelto en el agua, como ocurrió en la “Piscigranja B” en donde los meses en que se registró incremento de la concentración de fosfatos en el agua, también se produjo una disminución del oxígeno disuelto a niveles inferiores del rango vital para el cultivo de la trucha arcoíris.

La concentración de Nitrógeno amoniacal está relacionado a la producción de los desechos de amoníaco por parte de los peces de cultivo y también a la descomposición de cualquier tipo de materia orgánica en agua, tales como heces, restos de comida, o material vegetal muerto (Roberts, 2007). En la “Piscigranja” durante la temporada de inicio de lluvias y la temporada de lluvias se observó un incremento del nitrógeno amoniacal por encima del rango óptimo (<0.001mg/L) a diferencia de la temporada seca donde el valor del nitrógeno amoniacal se encontraba dentro del rango permisible, esto responde posiblemente a un pobre manejo ambiental por falta de estrategia para un adecuado manejo de los sistemas de cultivo durante la temporada de inicio de lluvias y temporada de lluvias así como también por la inadecuada limpieza de las pozas de cultivo.

La alcalinidad del agua ($\text{pH} > 7$), así como los incrementos de temperatura del agua observadas en las piscigranja estuvieron dentro del rango vital para el cultivo de trucha arcoíris; sin embargo, si adicionamos la existencia de nitrógeno amoniacal alto es necesario indicar que la se presento mucho mayor riesgo de incremento de concentración de amoníaco no ionizado (NH_3), el cual es mucho más tóxico para los peces de cultivo, debido a que su presentación está asociado con pH incrementado y temperaturas altas (Roberts, 2007).

Es común encontrar signos clínicos similares para la mayoría de las enfermedades infecciosas y no infecciosas en los peces de cultivo como la melanosis, que es una respuesta común a la enfermedad en los salmónidos, donde los peces enfermos suele ser más oscuros de lo normal debido a la pigmentación de melanina en la piel que está bajo control neuroendocrino y se ve afectado por las hormonas, como la adrenalina (hormona del estrés) (Noga, 2005). Esta melanosis en los peces observados sugiere un estado de alteración de la salud de los peces estudiados signo que se observó en todas las temporadas, lo cual podría relacionarse a la mala

calidad del agua lo cual se corroboró por el hallazgo de una muy baja concentración de Oxígeno disuelto y nitrógeno amoniacal.

Sin embargo, estudios anteriores en la “Piscigranja” han demostrado problemas por infecciones específicas con *Y. ruckeri* (Sierralta, 2011), fúngicas como el hongo sistémico *Ictiophonus hoferi* (Rosenthal, 2007); desordenes metabólicos (Chávez, 2007) y la enfermedad bacteriana de riñón (BKD)(Arauco, 2010) donde se evidenció granulomas en riñón así como en el hígado de peces afectados, tanto macroscópicamente como microscópicamente, además de otros signos como melanosis, exoftalmia, exoftalmia, palidez hepática (Talavera, 2008) .Estas deben ser tomados en cuenta como parte del historial clínico para llegar a un diagnostico certero. Por otro lado las patologías virales y parasitarias, que también reproducen estos signos, aun no han sido determinadas en el país.

La mayoría de lesiones observadas en la “Piscigranja” evidencian problemas de enfermedad sistémica, siendo de origen posiblemente infeccioso como la causada por la bacteria *Yersinia ruckeri*, que produce lesiones asociadas con hemorragias en diferentes tejidos similar a lo observado en este estudio. Por otro lado, el hallazgo de distensión estomacal asociada a la presencia de retención de alimento no digerido y liquido mucoso, la cual estuvo muy relacionada ala distensión abdominal, además de otros signos entéricos como la dilatación y congestión del intestino posterior y las petequias en ciegos pilóricos también presentes, permite inferir una afección del sistema gastrointestinal de origen bacteriano, como la *Y. ruckeri* principalmente, e incluso, de afección sistémica debido al hallazgo moderado de esplenomegalia la cual puede ser causada por alteraciones hematológicas como respuesta a infecciones generalizadas (Ellis *et al*, 2004).

La alta frecuencia de palidez hepática en los hallazgos de la “Piscigranja” indica lipidosis hepática debido alteraciones metabólicas por exceso de energía (dietas desequilibradas), propios de los sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo (Noga, 2010).

Se encontraron frecuentes observaciones de lesiones oculares como exoftalmia, hipema y opacidad ocular las cuales son comunes en varias enfermedades infecciosas, entre ellas bacterianas como la relacionada a *Y. ruckeri* descrita anteriormente. Por otro lado las lesiones oculares a menudo indican también una posible causa traumática. Así mismo muchas deficiencias nutricionales también están asociados con patología ocular (Noga, 2010).

Las úlceras en la piel y la podredumbre de aletas caudales de moderada frecuencia en la “Piscigranja”, son sugerentes de *Flavobacterium sp.* la cual fue reportada por (León *et al.*, 2008) en piscigranjas de la región .

En el estudio también se encontró granulomas tanto en hígado como en riñón, lesiones que nos sugieren que podría ser *R. salmoninarum* (Ferguson, 2006), además del antecedente de la piscigranja, sin embargo los resultados a la prueba de PCR tiempo real fueron negativos, lo cual indicaría que las lesiones son producidas por otro agente infeccioso, como el hongo *Ictiofonus sp.* que ha sido descrito por otros investigadores en diferentes estudios y épocas (Mateo, 1996; Rosenthal, 2007 ; Chavez, 2008; Talavera, 2008) indicando que este agente sigue endémico en esta piscigranja, lo que explicaría la presencia de este tipo de lesión.

Los hallazgos de PCR tiempo real demostraron la ausencia de ADN de *Renibacterium salmoninarum* en las muestra de peces, esto significa que la prevalencia es 0%, valor muy diferente a lo señalado por Talavera (2008) y Arauco (2010), en otros estudios. Sin embargo esto no es suficiente como para reconocer a la piscigranja como oficialmente "libre de *Renibacterium*". Es necesario incluir una vigilancia conformada por 2 inspecciones y exámenes por año, durante un período de al menos dos años (Baudin, *et al* 1999).

6. CONCLUSIONES

1. No se identificó molecularmente la presencia del agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón, *Renibacterium salmoninarum*.
2. La prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* en los peces de cultivo de las piscigranjas estudiadas es de 0%.
3. No se pudo establecer una asociación entre la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* y el ciclo de lluvias del periodo 2011-2102 en la región de Junín.

7. LITERATURA CITADA

1. **Arauco D. 2010.** Estandarización y validación de PCR en tiempo real para la enfermedad bacteriana renal (BKD) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para optar el título MV. Lima Perú: Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fac Med Ver-130 p.
2. **Austin B, Austin D A. 2007.** Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish 2007. Fourth Edition. © Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, Pag239-242
3. **Austin B y Austin DA. 1987.** Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 2nd edition. Ellis Horwood Limited. Chichester, England. 384 pp.
4. **Baudin F, Gorgetti G, Hill B, Koski P, Olesen NJ, Parodi AM y Schlotfeldt HJ. 1999.** Report of The Scientific Committee on animal Health and Animal Welfare: Bacterial Kidney Disease. European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General (DG-Sanco) 1-44. [Internet], [09 Octubre 2012]: Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out36_en.pdf
5. **Benediktsdóttir E, Helgason S y Gudmundsdóttir S. 1991.** Incubation time for the cultivation of *Renibacterium salmoninarum* from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. broodfish. Journal of fish diseases 14(1): 97-102
6. **Bonga, S.E.W. 1997.** The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591–625.
7. **Brooks N, Adger W N. 2003.** Country level risk measures of climate-related natural disasters and implications for adaptation to climate change, Tyndall Centre Working Paper 26 [Internet], [09 Octubre 2011]: Disponible en: http://www.tyndall.ac.uk/publications/working_papers/wp26.pdf.

8. **Brown LL, Evelyn TPT, Iwama GK, Nelson WS y Levine RP. 1995.** Bacterial species other than *Renibacterium salmoninarum* cross react with antisera against *R. salmoninarum*, but are negative for the p57 gene of *R. salmoninarum* as detected by the polymerase chain reaction (PCR). *Diseases of Aquatic Organisms*. 21:227-231.
9. **Brown LL, Iwama GK, Evelyn TPT, Nelson WS y Levine RP. 1994.** Use of PCR to detect DNA from *R. salmoninarum* within individual salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 18: 165-171.
10. **Bruno DW y Munro AL. 1986b.** Uniformity in the biochemical properties of *Renibacterium salmoninarum* isolates obtained from several sources. *Federation of European Microbiological Societies - FEMS: Microbiology Letters* 33: 247-250.
11. **Bruno DW, Alderman DJ y Schlotfeldt HJ. 1997.** ¿Qué debo hacer? Un manual práctico para el maricultor. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 64 p.
12. **Campos-Perez JJ, Ellis AE, y Secombes CJ. 1997** Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 7:555–566.
13. **Cánepa de Vargas L, Maldonado V, Aurazo M, 2004.** Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: teoría. Tomo I. Lima, CEPIS, 2004, p.2-56 Ilus., tab. [Internet] [09 noviembre 2012] Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsatr/fulltext/tratamiento/manualI/tomoI/uno.pdf>
14. **Chase DM, Elliott DG y Pascho RJ. 2006.** Detection and quantification of *Renibacterium salmoninarum* DNA in salmonid tissues by real-time quantitative polymerase chain reaction analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18(4): 375-380.
15. **Chavez E. 2007.** Frecuencia y características de lesiones anatomohistopatológicas compatibles con alteraciones metabólicas relacionadas a energía y/o proteína en la dieta de truchas arcoíris fase juvenil. Tesis para optar el título MV. Lima Perú: Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fac Med Ver-130 p.
16. **Coady AM, Murray AL, Elliott DG, y Rhodes LD. 2006.** *Bothmsa* genes in *Renibacterium salmoninarum* are needed for full virulence in bacterial kidney disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2672–2678.

17. **Conte F S. 2004.** Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 205–23.
18. **Costa J. 2004.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(5):299-305.
19. **De Silva S y Soto D. 2009.** Climate change and aquaculture: potential impacts, adaptation and mitigation. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 530*: 151-212.
20. **Daly JG y Stevenson RM. 1987.** Hydrophobic and haemagglutinating properties of *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of general microbiology* 133: 3575-3580.
21. **Daly JG y Stevenson RM. 1985.** Charcoal Agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Applied Environmental Microbiology* 50(4):868-871.
22. **Dubreuil D, Lallier R y Jacques M. 1990b.** Immunoelectron microscopic demonstration that *Renibacterium salmoninarum* is encapsulated. *Federation of European Microbiological Societies - FEMS: Microbiology Letters* 66(1-3): 313- 316.
23. **Dubreuil JD, Jacques M, Graham L y Lallier R. 1990.** Purification and biochemical and structural characterization of a fimbrial haemagglutinin of *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of General Microbiology* 136: 2443–2448.
24. **Earp BJ, Ellis CH y Ordal EJ. 1953.** Kidney disease in young salmon. University of Washington, Department of Fisheries in cooperation with Department of microbiology, oceanography and the school of fisheries. Report 1. 1-74
25. **Eissa AE, Elsayed EE; McDonald R y Faisal M. 2006.** First record of *Renibacterium salmoninarum* in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Journal of wildlife diseases*. 42(3):556-60.
26. **Eissa AE. 2005.** Bacterial kidney disease (BKD) in Michigan salmonids. PhD Dissertation. Michigan State University, East Lansing, Michigan, 210 pp.
27. **Enríquez R, Ortega C, Salgado C y Vega F. 2000.** Recomendaciones para la Prevención y Control de la Necrosis Pancreática Infecciosa Viral (IPNV) en los Cultivos de Trucha. *Boletines del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*. México. 4:7-8.

28. **Evenden AJ, Grayson TH, Gilpin ML y Munn CB.1993.** Renibacterium salmoninarum and bacterial kidney disease – the unfinished jigsaw. Annual Review of Fish Diseases. 3: 87-104.
29. **Evelyn TPT. 1993.** Bacterial Kidney Disease-BKD. p. 177-195. En: Bacterial Diseases of Fish. Editado por Inglis V, RJ Roberts y N Bromage. R. Blackwell Scientific Publications. London. 312 p.
30. **Ellis A., Hardy R, Munro A., Roberts R, Rodger H., Smail D., 2004.** Fish pathology. 3ra Edicion. 500pp
31. **Evelyn TPT. 1977.** An improved growth medium for the kidney disease bacterium and some notes on using the medium. Bulletin of Office of International Epizootics 87:511-513.
32. **FAO. 2009.** Cultured Aquatic Species Information Programme. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Actualizado al 20 de Octubre de 2011. [Internet] [09 noviembre 2012] Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/en
33. **FAO. 2009.** Climate change implications for fisheries and aquaculture. Overview of current scientific knowledge. [Internet], [09 Octubre 2011] Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0994e/i0994e00.pdf>,
34. **FAO. 2011.** Base de datos de Pesca y Acuicultura de la FAO, Fishstat Plus.
35. **Ferguson H. 2006.** Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. Second Edition. Scotian Press. London. 368p.
36. **Ficke, A D, Myrick C A, Hansen L J. 2007.** Potential impacts of global climate change on fresh water fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17: 581–613. Fryer, J. L., and J. L. Sanders. 1981. Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Annual Reviews in Microbiology* 35:273–298.
37. **Grayson TH, Atienzar FA, Alexander SM, Cooper LF y Gilpin ML. 2000.** Molecular diversity of *Renibacterium salmoninarum* isolates determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis. Applied and environmental microbiology. 66(1): 435-438.
38. **Grayson TH, Bruno DW, Evenden AJ, Gilpin ML, and Munn CB. 1995.** Iron acquisition by *Renibacterium salmoninarum*: contribution of iron reductase. Diseases of Aquatic Organisms, 22:157–164.

39. **Godoy M. 2002.** Truchicultura. 2° Edición. Perú: Editorial Perú Impreso. 247 pp.
40. **Goodfellow M, Embley TM y Austin B. 1985.** Numerical taxonomy and emended description of *Renibacterium salmoninarum*. Journal of general microbiology 131: 2739- 2752.
41. **Graysson T, Cooper L, Wrathmell A, Rper J, Evenden Am, Gilpin M. 2002.** Host Responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanism of immune suppression and activation Immunology. 106(2): 273-283.
42. **Gutenberger SK, Duimistra JR, Rohovec JS y Fryer JL. 1997.** Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. Diseases of aquatic organisms. 28(2): 93-106.
43. **Halaihel N, Vendrell D, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Alonso JL, Gironés O, Pérez T y Muzquiz JL. 2009.** A new real time PCR-based assay for diagnosing *Renibacterium salmoninarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and comparison with other techniques. Journal of microbiological methods. 76(1):75-80.
44. **Handysde N, Ross L G, Badgec M C, Allson E H. 2006.** The effects of climate change on world aquaculture: a global perspective. Final Technical Report. DFD Aquaculture and Fish Genetics Research Programme. Stirling Institute of Aquaculture, Stirling U.K. 151 pp. [Internet], [09 Octubre 2011] Disponible en WWW.aqua.stir.ac.uk/GISAP/pdfs/climate-full.
45. **Hirvelä-Koski V, Pohjanvirta T, Koski P y Sukura A. 2005.** Atypical growth of *Renibacterium salmoninarum* in subclinical infections. Journal of Fish Diseases 29(1):21-29.
46. **Hsu H, Wooster GA y Bowser PR. 1994.** Efficacy of Enrofloxacin for the Treatment of Salmonids with Bacterial Kidney Disease, Caused by *Renibacterium salmoninarum*. Journal of Aquatic Animal Health. 6(3): 220-223.
47. **Instituto Geofísico del Perú-IGP, 2005.** Diagnostico de la cuenca del Mantaro bajo la visión del cambio climático. Editor CONAM. Consejo nacional del ambiente. [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: http://www.met.igp.gob.pe/publicaciones/2000_2007/Diagnostico.pdf
48. **Jansson E, Lindberg L, Säker E, Aspán A. 2008.** Diagnosis of bacterial kidney disease by detection of *Renibacterium salmoninarum* by real-time PCR. Journal of Fish Diseases. 31(10): 755 – 763.

49. **Jansson E. 2002.** Bacterial Kidney Disease in Salmonid fish. Development of methods to assess immune functions in salmonid fish during infection by *Renibacterium salmoninarum*. Doctoral thesis. Swdih uiversity of agricultural Sciences.Sweden.51 p.

50. **Kaattari S. 2000.** Bacterial Kidney Disease Vaccine Development and Immunity. Libro de Resúmenes IV Jornadas de Salmonicultura- XI Congreso de Medicina Veterinaria. Puerto Varas, Chile. 25-27 de octubre. 72-74p.

51. **Kettler S, Pfeil-Putzien C y Hoffmann R. 1986.** Infection of grayling (*Thymallus thymallus*) with the agent of bacterial kidney disease (BKD). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 6(3): 69–71.

52. **Kinkelin, P; Michel, C. Ghittino, P. 1991.** Tratado de las enfermedades de los peces. Acribia, Madrid, 1991. 353pp

53. **Lee E y Evelyn TPT. 1994.** Prevention of vertical transmission of the bacterial kidney disease agent *Renibacterium salmoninarum* by broodstock injection with erythromycin. Diseases of Aquatic Organisms. 18: 1-4.

54. **Lee E y Gordon M R. 1987.** Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. Aquaculture. 65: 7-14.

55. **Leon J. Avalos R. Ponce M, 2008.** *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. Revista Peruana de Biología. 15(2): 117- 124 [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: http://ateneo.unmsm.edu.pe/ateneo/bitstream/123456789/1850/1/revista_peruana_de_biologia17v15n2_2008.pdf

56. **Linn M and Yael B. 2008.** Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): A Technical Conservation Assessment. USDA Forest Service, Rocky Mountain Region. [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: <http://www.fs.fed.us/r2/projects/scp/assessments/rainbowtrout.pdf> [date of access].

57. **Lall S P, Paterson W D, Adams N J. 1985.** Control of bacterial kidney disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by dietary modification. *Journal of Fish Diseases* 8:113–124.

58. **Magnusson HB, Frijonsson OH, Andresson OS, Benediktsdottir E, Gudmundsdottir S y Andresdottir V. 1994.** *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney

disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcription-PCR of 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (12): 4580-4583.

59. Mesa MG, Poe TP, Maule AG y Schreck CB. 1998. Vulnerability to predation and physiological stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*. 55(7): 1599-1606.
60. Ministerio del Ambiente. 2010. Segunda Comunicación Nacional del Perú a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/dmdocuments/SCNCC-MINAM.pdf>
61. Ministerio de la Producción. 2011. Informe: Panorama de la acuicultura Mundial, América Latina y el Caribe y el Perú. Editado por la Dirección general de Acuicultura. [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: http://www.racua.org/uploads/media/informe_acuicultura_mundo_al_peru.pdf
62. Miriam A, Griffiths SG, Lovely JE y Lynch WH. 1997. PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon ovarian fluid and kidney tissue for presence of DNA of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (6):1322-1326.
63. Moffitt CM. 1991. Oral and injectable applications of erythromycin in salmonid fish culture. *Veterinary and human toxicology*. 33(1): 49-53
64. Morales V V Q, Morales RR 2006. Regional review on aquaculture development 1. Latin America and the Caribbean - 2005. Rome. FAO Fisheries Circular, F1017/1. 177pp. FAO.
65. Noga Edward J. 2010. Fish Disease *Diagnosis and Treatment* Second Edition. Iowa State University Press USA. Pag201-204.
66. OIE. 2006. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. 5a edición, 2006. Copyright © 2007 OIE- Organización Mundial de Sanidad Animal, 12 rue de Prony 75017 Paris (France)
67. OIE, 2009. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Título I, Capítulo 1.4 Vigilancia de sanidad de los animales acuáticos.
68. ONU. Organización de Naciones Unidas. 1992. Convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. [Internet], [09/11/2012]. Disponible en:

http://unfccc.int/files/essential_background/background_publications_htmlpdf/application/pdf/convsp.pdf

- 69. Paterson W D, Lall S P, Desautels D. 1981b.** Studies on bacterial kidney disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Canada. *Fish Pathology* 15:283–292.
- 70. Pascho JR, Chase D y McKibben CL. 1998.** Comparison of the membrane-filtration fluorescent antibody test, the enzyme-linked immunoadsorbent assay, and the polymerase chain reaction to detect *Renibacterium salmoninarum* in salmonid ovarian fluid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10 (1): 60-66.
- 71. Pfeil-Putzien C, Hoffmann R y Popp W. 1985.** Preliminary report on the occurrence of bacterial kidney disease in Germany. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 5(2): 30–31.
- 72. Peddie S. 2004.** Husbandry related disease in finfish aquaculture: nephrocalcinosis. *Fish Farmer* 27 (3): 37.
- 73. Plumb J A. Hanson L A. 1994.** Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd., Publication. pag380-384.
- 74. Powell M, Overtut K, Hogge C, Johnson K. 2005.** Detection of *Renibacterium salmoninarum* in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), using quantitative PCR. *Journal of Fish Diseases*. 28: 615–622.
- 75. Quintana A. 2001.** Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. *Revista Electrónica de acuicultura*. N°14 [Internet], [15 Octubre 2011] Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.esp>
- 76. Rackocy J E. 2005.** Programa de informacion de especies acuaticas. Text by February In:FAO. Fisheries and Aquaculture Department (On line). Rome. Updated . 18 February. [Internet], [15 Octubre 2011] Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchusmykiss/es>
- 77. Roberts H. 2007.** Fundamental of Ornamental Fish Health. Ed Willey Brackwell. USA. 244pp.
- 78. Rockey DD, Turaga PSD, Wiens GD, Cook BA y Kaattari SL. 1991b.** Serine proteinase of *Renibacterium salmoninarum* digests a major autologous extracellular and cell-surface protein. *Canadian Journal of Microbiology* 37(10): 758–763.

- 79. Rosenthal S. 2007.** Frecuencia de lipidosis hepática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. Tesis para optar el título de MV. Lima- Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.74 p
- 80. Sanders JE y Fryer JL. 1980.** *Renibacterium salmoninarum* gen. nov. sp. nov. , The causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. International Journal of Systematic Microbiology 30:496-502.
- 81. Sakai MS y Kobayashi M. 1992.** Detection of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, from pen-cultured coho salmon. Applied and Environmental Microbiology 58(3): 1061–1063.
- 82. Servicio Nacional de Pesca de Chile-SERNAPESCA. 2011.** Situación sanitaria de la trucha de Chile y normativa asociada a agua dulce. Seminario trucha 1.2. [Internet], [15 Octubre 2011] Disponible en: <http://www.biomar.com/Countries/Chile/Eventos1/Gallardo.pdf>
- 83. Sharp G D. 2003.** Future climatic change and regional fisheries: a collaborative analysis. Rome. FAO. FAO Fisheries Technical Papers. N°452 75pp.
- 84. Sierralta V. 2011.** Estado situacional de *Yersenia ruckeri* causante de la enfermedad entérica de la Boca Roja en trucha Arco Iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en piscigranjas de la sierra central del Perú - 2008. Tesis para optar el grado académico de Magister en recursos acuáticos, mención en Acuicultura.
- 85. Slava P. 2009.** Principales problemas sanitarios en peces de aguas caldas en Colombia: aproximación a la situación sanitaria de la piscicultura comercial. IALL-UNILLAS-Colombia
- 86. Smith P, Larenas J, Vera P, Contreras J, Venegas C, Rojas M y Guajardo A. 2001.** Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. Monografías de Medicina Veterinaria 21(2).
- 87. Smith I W. 1964.** The occurrence of pathology of Dee disease. *Department of Agriculture of Fisheries, Scottish Freshwater Salmon Fisheries Research*34:1–12.
- 88. Snieszko S F. 1974.** The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6 (2): 197–208.

89. **Soto D, Aguilar-Manjarrez J, Brugeré C, Angel D, Baley. Black k, Edwards P, Costa Pierce B, Chopin T, Deudero S, Freeman S, Hambrey J, Hishamunda N, Knwler D, Silver W, Marba N, Mathe S, Norambuena R, Simard F, Tett P, TRoell M, Wainberg A. 2008.** Apling an Ecosystem based approach to aquaculture: principlesn scales and sime management measures. In D. Soto J. Aguilar-Manjarrez & N. Hsahmunda, (eds). Building an ecosystem approach to aquaculture. FAO /Unversitat de les Illes Balears Expete Workshop. 7-11 May 2007 Span Mallorca. FAO Fsheries Proceedngs N°14 Rome FAO pp 15-35.
90. **Starliper CE, Smith DR y Shatzer T. 1997.** Virulence of *Renibacterium salmoninarum* to salmonids. Journal of aquatic animal health. 9(1): 1-7.
91. **Suzumoto BK, Schreck CB y McIntyre JD. 1977.** Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. Journal of the fisheries research board of Canada. 34:18.
92. **Talavera L A. 2008.** Determinación de Presencia de *Renibacterium salmoninarum* y caracterizacon renal de lesiones histopatologicas presentes en truchas arcoiris (*Onchorynchus mikyss*) en crianza comercial. Tesis para otpar el título de MV Lima-Perú: Unversidad Nacinoal Mayor de San Marcos Fac Med Vet. 100 p
93. **UNEP. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 2010.** Avances y progresos científicos en nuestro cambiante medio ambiente. [Internet], [09 noviembre 2012]. Disponible en: http://www.unep.org/yearbook/2010/PDF/UNEP_ES_2010_low.pdf
94. **Warren J W. 1963.** Kidney disease of salmonid fishes and the analysis of hatchery waters. *TheProgressive Fish-Culturist* 25:121–131.
95. **Wiens, G. D y S. L. Kaattari. 1999.** Bacterial kidney disease (*Renibacterium salmoninarum*), p. 269-301. In P. T. K. Woo and D. W. Bruno (ed.), Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections, vol. 3. CAB International, Oxon, United Kingdom.
96. **Winter GWCB, Schreck CB y McIntyre JD. 1980.** Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. U.S. Dept. of Commerce. Fishery Bulleti. 77:795-802.
97. **Woo PTK y Bruno DW. 1999.** Fish diseases and disorders, Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections. Oxon, Reino Unido: Editorial CABI. 874 pp.

- 98. Woodall A N, Laroche G. 1964.** Nutrition of salmonid fishes, XI. Iodide requirements of chinook salmon. *Journal of Nutrition* 824:475–482.
- 99. Wood PA and Kaattari SL. 1996.** Enhanced immunogenicity of *Renibacterium salmoninarum* in chinook salmon after removal of the bacterial cell surface-associated 57 kDa protein. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25:71–79.
- 100. Young CL y Chapman GB. 1978.** Ultrastructural aspects of the causative and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35:1234-1248

8. ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Los procedimientos se realizarán con mascarilla, guantes y lentes protectores.

PREPARACIONES PREVIAS:

Búfer de Lavado: Agregar etanol 96-100% al Búfer de Lavado I y II, de acuerdo a las instrucciones de cada envase, mezclar bien. Almacenarlos a temperatura ambiente.

Búfer de Digestión de Lisozima: Solución preparada con Tris HCL 25mM, EDTA 2.5mM, Triton X-100 al 1%, esta solución debe tener un PH de 8.0.

Búfer de Digestión de Lisozima + Lisozima: utilizar 200 µl del Búfer de Digestión de Lisozima y 4 mg de lisozima liofilizada de forma que al final se obtiene una concentración de lisozima de 20 mg/ml. Esta preparación es por cada muestra a trabajar.

Búfer de Digestión de Lisozima	200 µl	x N
--------------------------------	--------	-----

Lisozima	4 mg	x N
----------	------	-----

*N: numero de muestras a trabajar

Preparar baño maría a 55°C y a 37°C.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 250 µl de muestra* en un tubo de microcentrífuga para ser peletizado centrifugando a 6 000 RPM por 1 minuto y medio a temperatura ambiente, eliminar el liquido sobrenadante y quedarse únicamente con el pellet.
2. Resuspender en 180 µl de Búfer de Digestión de Lisozima con lisozima (descrito arriba), dar un ligero vortex para homogenizar.
3. Incubar a 37°C por 30 minutos aproximadamente, vorteando el tubo de microcentrífuga cada 10 minutos.
4. Agregar 20 µl de proteinasa K (incluido en el kit de Invitrogen). Dar un ligero vortex para homogenizar.
5. Agregar 200 µl del Genomic Lysis/Binding Buffer TM (incluido en el kit de Invitrogen) homogenizar con vortex.

*Colonias bacterianas resuspendidas en suero fisiológico.

6. Incubar a 55°C por 30 minutos aproximadamente, vorteadando el tubo de microcentrífuga cada 10 minutos. En caso de que la muestra no esté totalmente lisada incubar por más tiempo (hasta 4 horas de ser necesario).
7. Agregar 200 µl de Etanol al 100% y dar un vortex por 5 segundos, hasta obtener una solución homogénea.
8. Agregar 500 µl de la mezcla anterior a la Membrana de Sílica (incluida en el kit).
9. Centrifugar a 10 000 G por 1 minuto a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un nuevo tubo de colección (incluido en el kit).
10. Agregar 500 µl de Solución de Lavado I preparado con anterioridad y llevar a centrifugar a 10 000 G por 1 minuto a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un nuevo tubo de colección (incluido en el kit).
11. Agregar 500 µl de Solución de Lavado II preparado con anterioridad y llevar a centrifugar a 20 000 G por 3 minutos a Temperatura ambiente. Descartar el líquido del tubo y cambiar la membrana de sílica a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril y libre de nucleasas.
12. Agregar 60 µl de Buffer de Elusión (incluido en el kit) e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
13. Llevar a centrifugar a 20 000 G por 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo de microcentrífuga tendrá el ADN genómico purificado.
14. Eliminar la membrana de sílica, alicuotar en tubos de microcentrífuga de 0.5 ml estériles libres de nucleasas y almacenar el ADN genómico purificado en congelación, si su uso es inmediato a 4°C, si se desea almacenar por tiempo prolongado a -20°C.

ANEXO 2

PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL

Los procedimientos se realizarán con mascarilla, guantes y lentes protectores.

PREPARACIONES PREVIAS:

Tener un contenedor con hielo para mantener la temperatura de los reactivos utilizados.

Rox: El rox debe diluirse con anterioridad hasta conseguir una solución de 1:10.

Rox (puro)	10 µl
Agua libre de nucleasas	90 µl

Mix de PCR: este debe prepararse en un tubo de microcentrífuga de 2ml de capacidad.

SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	10 µl	} x N
Forward primer,	0.4 µl (200 nM conc. Final)	
Reverse primer,	0.4 µl (200 nM conc. Final)	
ROX (Diluido 1:10)	1 µl	
Agua libre de nucleasas	7.2 µl	

*N: numero de muestras a trabajar, además de los controles positivos y un blanco (agua).

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar el mix de PCR en hielo hasta su uso.
2. Colocar 19 µl de mix de PCR en tubos en tiras para PCR a tiempo real nuevos.
3. Agregar 1 µl de ADN de la muestra y pipetear para mezclar bien.
4. Tapar los tubos debidamente para evitar evaporación.
5. Llevar la tira de tubos al termociclador.
6. Programar la computadora con el siguiente protocolo de temperaturas:
 - Incubar a 50°C por dos minutos (00.02.00)
 - Incubar a 95°C por diez minutos (00.10.00)
 - Incubar a 95°C por quince segundos (00.00.15)
 - Incubar a 60°C por un minuto (00.01.00)
 - Leer la placa
 - Ir a línea 3 por 40 veces más
 - Curva de Melting de 65.0°C a 95°C, leer cada 0.3°C manteniendo 2 segundos (00.00.02)
 - Incubar a 4.0°C indefinidamente
7. Iniciar proceso. Al finalizar, leer los resultados.

ANEXO 3

**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PCR A TIEMPO REAL PARA LAS MUESTRAS
TOTALES**

	MUESTRA	PCR			ESTATUS PCR
		Tm	C(T)	ng/μl	
1	Pool 01	NM	None	N/A	Negativo
2	Pool 02	NM	None	N/A	Negativo
3	Pool 03	NM	None	N/A	Negativo
4	Pool 04	NM	None	N/A	Negativo
5	Pool 05	NM	None	N/A	Negativo
6	Pool 06	NM	None	N/A	Negativo
7	Pool 07	NM	None	N/A	Negativo
8	Pool 08	NM	None	N/A	Negativo
9	Pool 09	NM	None	N/A	Negativo
10	Pool 10	NM	None	N/A	Negativo
11	Pool 11	NM	None	N/A	Negativo
12	Pool 12	NM	None	N/A	Negativo
13	Pool 13	NM	None	N/A	Negativo
14	Pool 14	NM	None	N/A	Negativo
15	Pool 15	NM	None	N/A	Negativo
16	Pool 16	NM	None	N/A	Negativo
17	Pool 17	NM	None	N/A	Negativo
18	Pool 18	NM	None	N/A	Negativo
19	Pool 19	NM	None	N/A	Negativo
20	Pool 20	NM	None	N/A	Negativo
21	Pool 21	NM	None	N/A	Negativo
22	Pool 22	NM	None	N/A	Negativo
23	Pool 23	NM	None	N/A	Negativo
24	Pool 24	NM	None	N/A	Negativo
25	Pool 25	NM	None	N/A	Negativo
26	Pool 26	NM	None	N/A	Negativo
27	Pool 27	NM	None	N/A	Negativo
28	Pool 28	NM	None	N/A	Negativo
29	Pool 29	NM	None	N/A	Negativo
30	Pool 30	NM	None	N/A	Negativo
31	Pool 31	NM	None	N/A	Negativo
32	Pool 32	NM	None	N/A	Negativo
33	Pool 33	NM	None	N/A	Negativo
34	Pool 34	NM	None	N/A	Negativo
35	Pool 35	NM	None	N/A	Negativo
36	Pool 36	NM	None	N/A	Negativo
37	Pool 37	NM	None	N/A	Negativo
38	Pool 38	NM	None	N/A	Negativo
39	Pool 39	NM	None	N/A	Negativo
40	Pool 40	NM	None	N/A	Negativo
41	Pool 41	NM	None	N/A	Negativo
42	Pool 42	NM	None	N/A	Negativo
43	Pool 43	NM	None	N/A	Negativo
44	Pool 44	NM	None	N/A	Negativo
45	Pool 45	NM	None	N/A	Negativo
46	Pool 46	NM	None	N/A	Negativo
47	Pool 47	NM	None	N/A	Negativo
48	Pool 48	NM	None	N/A	Negativo
49	Pool 49	NM	None	N/A	Negativo
50	Pool 50	NM	None	N/A	Negativo
51	Pool 51	NM	None	N/A	Negativo
52	Pool 52	NM	None	N/A	Negativo
53	Pool 53	NM	None	N/A	Negativo
54	Pool 54	NM	None	N/A	Negativo
55	Pool 55	NM	None	N/A	Negativo
56	Pool 56	NM	None	N/A	Negativo
57	Pool 57	NM	None	N/A	Negativo
58	Pool 58	NM	None	N/A	Negativo
59	Pool 59	NM	None	N/A	Negativo
60	Pool 60	NM	None	N/A	Negativo
61	Pool 61	NM	None	N/A	Negativo
62	Pool 62	NM	None	N/A	Negativo

63	Pool 63	NM	None	N/A	Negativo	80	Pool 80	NM	None	N/A	Negativo
64	Pool 64	NM	None	N/A	Negativo	81	Pool 81	NM	None	N/A	Negativo
65	Pool 65	NM	None	N/A	Negativo	82	Pool 82	NM	None	N/A	Negativo
66	Pool 66	NM	None	N/A	Negativo	83	Pool 83	NM	None	N/A	Negativo
67	Pool 67	NM	None	N/A	Negativo	84	Pool 84	NM	None	N/A	Negativo
68	Pool 68	NM	None	N/A	Negativo	85	Pool 85	NM	None	N/A	Negativo
69	Pool 69	NM	None	N/A	Negativo	86	Pool 86	NM	None	N/A	Negativo
70	Pool 70	NM	None	N/A	Negativo	87	Pool 87	NM	None	N/A	Negativo
71	Pool 71	NM	None	N/A	Negativo	88	Pool 88	NM	None	N/A	Negativo
72	Pool 72	NM	None	N/A	Negativo	89	Pool 89	NM	None	N/A	Negativo
73	Pool 73	NM	None	N/A	Negativo	90	Pool 90	NM	None	N/A	Negativo
74	Pool 74	NM	None	N/A	Negativo	91	Pool 91	NM	None	N/A	Negativo
75	Pool 75	NM	None	N/A	Negativo	92	Pool 92	NM	None	N/A	Negativo
76	Pool 76	NM	None	N/A	Negativo	93	Pool 93	NM	None	N/A	Negativo
77	Pool 77	NM	None	N/A	Negativo	94	Pool 94	NM	None	N/A	Negativo
78	Pool 78	NM	None	N/A	Negativo	95	Pool 95	NM	None	N/A	Negativo
79	Pool 79	NM	None	N/A	Negativo	96	Pool 96	NM	None	N/A	Negativo

***Pool:** Equivalente a moliendas de riñón y bazo de 5 peces de un mismo origen.

***Tm:** Temperatura de Melting expresada en grados centígrados con el set de primers diseñados.

***C(T):** ciclo umbral de los productos obtenidos según el set de primers diseñados.

***ng/ μ l:** concentración de ácido nucleico de *Renibacterium salmonianrum* en las muestras expresado en nanogramos por microlitro.

***None:** Ausencia de ciclo umbral.

***N/A:** Ausencia de ácido nucleico de *Renibacterium salmonianrum* en las muestras expresado en nanogramos.

***NM:** Ausencia de Curva de Melting